

Untersuchungen zur Dynamik des Glukosestoffwechsels in Wistar und Zucker Diabetic Fatty Ratten:

**in vivo / ex vivo Studien zur Regulation
des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes**

CHRISTOPH M. SCHUMMER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
und
des Therapeutic Department Metabolism
der Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

Betreuer: PD Dr. Andreas W. Herling

**Untersuchungen zur Dynamik des Glukosestoffwechsels
in Wistar und Zucker Diabetic Fatty Ratten:
in vivo / ex vivo Studien zur Regulation des
Pyruvatdehydrogenase-Komplexes**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

CHRISTOPH MATTHIAS SCHUMMER

Tierarzt aus Neunkirchen (Saar)

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

Gutachter: PD Dr. Andreas W. Herling
PD Dr. Gerhard Schultheiß

Tag der Disputation: 10. März 2006

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen

Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-

Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

II.2.3.c	Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
II.2.3.d	Western-Blot	44
II.2.3.e	Rehybridisieren von Western-Blots	45
II.2.3.f	Antikörperfärbung	46
II.3	Klinisch chemische Analytik	48
II.3.1	Bestimmung der Stoffwechselfparameter im Blut/Serum	48
II.3.1.a	Glukose	48
II.3.1.b	Laktat	48
II.3.1.c	Insulin	48
II.3.1.d	Cholesterin	48
II.3.1.e	Triglyceride	48
II.3.1.f	Freie Fettsäuren	49
II.3.1.g	Ketonkörper	49
II.3.2	Bestimmung der Stoffwechselfparameter in Leber und Skelettmuskulatur	50
II.3.2.a	Organaufarbeitung	50
II.3.2.b	Bestimmung des Glykogengehaltes in Leber und Skelettmuskulatur	50
II.3.2.c	Bestimmung von ATP, Glukose-6-Phosphat (G6P), Fruktose-6-Phosphat (F6P) in Leber und Skelettmuskulatur	50
II.3.2.d	Bestimmung des Triglyzeridgehaltes in der Leber	50
II.4	Berechnungen und Statistik	51
II.4.1	Berechnungen	51
II.4.1.a	Netto-Blutglukoseprofil	51
II.4.1.b	Fläche unter der Kurve (AUC)	51
II.4.1.c	Kohlenhydrat- und Fettoxidation	51
II.4.1.d	Gesamtlebergglykogen	51
II.4.1.e	Gesamtgehalt an freier Glukose	51
II.4.1.f	Skelettmuskelmasse	51
II.4.1.g	Glykogengehalt der Skelettmuskulatur	52
II.4.1.h	Bilanzierung von Stoffwechselfparametern	52
II.4.2	Statistik	52
III.	Ergebnisse	53
III.1	oGTT bei Wistar Ratten	53
III.1.1	oGTT intraindividuell - Blutglukoseprofil	54
III.1.2	oGTT intraindividuell - Indirekte Kalorimetrie	57
III.1.3	oGTT interindividuell	60
III.1.3.1	Metabolische Parameter	61
III.1.3.1.a	Blut/Serum	61
III.1.3.1.b	Organparameter	64
III.1.4	Bilanzierung	67
III.2	oGTT bei 8 Wochen alten ZDF-Ratten	69
III.2.1	oGTT intraindividuell - Blutglukoseprofil	70
III.2.2	oGTT intraindividuell - Indirekte Kalorimetrie	72
III.2.3	oGTT intraindividuell - Renaler Glukoseverlust	74
III.2.4	oGTT interindividuell	75
III.2.4.1	Metabolische Parameter	76
III.2.4.1.a	Blut/Serum	76
III.2.4.1.b	Organparameter	80

III.2.4.2	Bilanzierung	87
III.2.4.3	Biochemische Parameter	91
III.2.4.3.a	PDH-Aktivität	91
III.2.4.3.b	PDK4 – Proteinmenge	94
III.2.4.3.c	PDH E1 α/β - Proteinmenge	96
III.3	oGTT bei 16 Wochen alten ZDF-Ratten	97
III.3.1	oGTT intraindividuell - Blutglukoseprofil	97
III.3.2	oGTT intraindividuell - Indirekte Kalorimetrie	99
III.3.3	oGTT intraindividuell - Renaler Glukoseverlust	101
III.3.4	oGTT interindividuell	102
III.3.4.1	Metabolische Parameter	103
III.3.4.1.a	Blut/Serum	103
III.3.4.1.b	Organparameter	107
III.3.4.2	Bilanzierung	114
III.3.4.3	Biochemische Parameter	117
III.3.4.3.a	PDH-Aktivität	117
III.3.4.3.b	PDK4 - Proteinmenge	120
III.3.4.3.c	PDK2 - Proteinmenge	122
III.3.4.3.d	PDH E1 α/β - Proteinmenge	123
III.4	DCA Studien	124
III.4.1	Akuter Effekt einer ein- und zweimaligen DCA Behandlung auf die PDH-Aktivität und die Glukoseoxidation	124
III.4.2	Akuter Effekt einer einmaligen DCA Behandlung auf das Blutglukoseprofil, die Kohlenhydrat- und Fettoxidation	130
IV	Diskussion	137
IV.1	in vivo Ergebnisse - oGTT	138
IV.1.1	oGTT – Wistar Ratten	138
IV.1.2	oGTT – 8 Wochen alte ZDF-Ratten	141
IV.1.3	oGTT – 16 Wochen alte ZDF-Ratten	144
IV.2	Biochemische Parameter	148
	Schlussfolgerungen aus den in vivo und ex vivo Analysen	153
IV.3	Pharmakologische Studien mit DCA	154
IV.4	Ausblick	158
V	Zusammenfassung	160
VI	Literaturverzeichnis	165
VII	Danksagung	177

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Coenzym A aktivierte Acetylgruppe
ADA	Amerikanische Diabetes-Vereinigung (<i>American Diabetes Association</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve (<i>area under curve</i>)
BCA	Bicinchoninsäure
BLU	Boeringer light units
BMI	Body Mass Index
BP	Bindungsprotein
Bq	Becquerel
BSA	Rinder-Serumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
c	Konzentration
C	Kohlenstoff (<i>carbon</i>)
CO ₂	Kohlendioxid
¹⁴ CO ₂	Kohlendioxid mit dem Kohlenstoff-Isotop C-14
CoA	Coenzym A
cpm	Counts per minute
D	Molekulargewicht in Dalton
d	Tag (<i>day</i>)
DCA	Dichloroacetat (<i>1,1-di-chlor-Ethansäure</i>)
DTT	1,4-Dithiothreitol
E1	Pyruvatdecarboxylase-Einheit
E1 _α	Pyruvatdecarboxylase-Untereinheit alpha
E1 _β	Pyruvatdecarboxylase-Untereinheit beta
E2	Lipotransacetylase
E3	Dihydrolipoatdehydrogenase
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F6P	Fruktose-6-Phosphat
Fa	Fatty Allel, Wildtyp
fa	fatty Allel, mutiertes Allel

FAD	Flavinadenindinukleotid
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid (reduziert)
FFS	Freie Fettsäuren
FO	Fettoxidation
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
G1P	Glukose-1-Phosphat
G6P	Glukose-6-Phosphat
GLUT	Glukosetransportprotein
h	Stunde (<i>hour</i>)
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (<i>high density lipoprotein</i>)
IDF	Internationaler Diabetes Verband (<i>International Diabetes Federation</i>)
IgG	Immunglobulin G
IVC	einzel belüftete Käfige (<i>individually ventilated cages</i>)
Kap.	Kapitel
kD	kilo Dalton (10^3 D)
kg	Kilogramm (10^3 g)
KGW	Körpergewicht
KHO	Kohlenhydratoxidation
KM	Körpermasse
λ-PPase	lambda Protein Phosphatase
LCA-CoA	Coenzym A aktivierte langkettige Fettsäure (Long Chain Acyl-Coenzyme A)
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (<i>low density lipoprotein</i>)
Lip-S ₂	Liponsäurerest
Lip-(SH ₂)	Liponsäurerest (reduziert)
m	Masse
M.	Muskel (<i>musculus</i>)
µg	Mikrogramm (10^{-6} g)
µl	Mikroliter (10^{-6} l)
µmol	Mikromol (10^{-6} mol)
mg	Milligramm (10^{-3} g)
min	Minute (<i>minute</i>)
ml	Milliliter (10^{-3} l)
mmol	Millimol (10^{-3} mol)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure

Abkürzungen

mRNS	messenger Ribonukleinsäure
mU	Milliunits
N	Stickstoff
n	Anzahl
N ₂ O	Distickstoffmonoxid / Lachgas
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat (reduziert)
nmol	Nanomol (10^{-9} mol)
O ₂	Sauerstoff (<i>oxygenium</i>)
oGTT	oraler Glukose Toleranz Test
P	Irrtumswahrscheinlichkeit / Signifikanz
p.o.	per os (durch den Mund)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDH-Komplex	Pyruvatdehydrogenase-Komplex
PDK	Pyruvatdehydrogenase-Kinase
PDK1	Pyruvatdehydrogenase-Kinase Isoform 1
PDK2	Pyruvatdehydrogenase-Kinase Isoform 2
PDK3	Pyruvatdehydrogenase-Kinase Isoform 3
PDK4	Pyruvatdehydrogenase-Kinase Isoform 4
PDP	Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase
pH	pondus Hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration)
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
ppm	parts per million
PVDF	Polyvinylidendifluorid
[1- ¹⁴ C]-Pyruvat	am 1. Kohlenstoffatom (Carboxylgruppe) radioaktiv markiertes Pyruvat mit dem Kohlenstoff-Isotop C-14
r	Regressionskoeffizient
RIA	Radioimmunoassay
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RQ	Respiratorischer Quotient
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde (<i>second</i>)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	mittlerer Fehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)

t	Zeit (<i>time</i>)
TG	Triglyzeride
TPP	Thiaminpyrophosphat
U	Einheit (<i>unit</i>)
UDP	Uridindiphosphat
V	Volumen
VLDL	Lipoprotein sehr niedriger Dichte (very low density lipoprotein)
Vol.%	Volumenprozent
vs.	gegen (<i>versus</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
ZDF	Zucker Diabetic Fatty
ZF	Zucker Fatty

I Einleitung

I.1 Diabetes mellitus

I.1.1 Terminus

Diabetes mellitus ist die Bezeichnung für eine Gruppe von Stoffwechselkrankheiten und bedeutet „honigsüßer Durchfluss“. Der Begriff beschreibt die Hauptsymptome der Erkrankung: verstärkten Harndrang (Polyurie) und vermehrte Ausscheidung von Glukose im Urin (Glukosurie). Der Zusatz „mellitus“ unterscheidet die Krankheit vom Diabetes insipidus, der auf einer gestörten Rückresorption von Wasser in den Nieren beruht.

I.1.2 Geschichte

Die Krankheit war bereits in der Antike bekannt: „Die Krankheit heißt Diabetes, denn es ist, als ließe man Wasser durch einen Siphon laufen“ (Aretaios, Arzt aus Kappadokien, 2. Jahrhundert nach Christus) (Stryer, 1988). 1868 beschreibt Paul Langerhans in seiner Doktorarbeit über die Bauchspeicheldrüse eigenartige „Zellhaufen“ (Langerhans, 1869), die Produktionsstätte des Insulins, die 1893 nach ihm benannt wurden. Sechs Jahre später entdeckt Oskar Minkowski den Zusammenhang zwischen Pankreas und der Blutglukose (McGarry, 1992). Erst 1921 gelang es Frederick Banting und Charles Best, das Hormon Insulin zu isolieren (McFarlane et al., 1997). Damit waren sie die ersten, die die Bedeutung des Insulins für die Pathophysiologie des Diabetes mellitus erkannten und somit eine wirkungsvolle Therapie ermöglichten. 1923 wurde ihnen hierfür der Nobelpreis verliehen.

I.1.3 Definition

Grundlage für die Klassifikation und die Diagnose des Diabetes mellitus sind die neuesten Bestimmungen einer internationalen Expertengruppe (The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus, 2003) unter Federführung der American Diabetes Association (ADA) und der World Health Organization (WHO).

Nach der Ätiologie erfolgt eine Klassifizierung in:

1. Typ 1 Diabetes
2. Typ 2 Diabetes
3. Andere spezifische Typen (Genetische Defekte, Erkrankungen des exokrinen Pankreas, Endokrinopathien, Infektionen und andere)
4. Gestationsdiabetes

Die Diagnose Typ 2 Diabetes gilt als gesichert, wenn eines der folgenden Kriterien erfüllt ist:

- Plasmaglukose $\geq 11,1$ mmol/l mit klassischer Polyurie- und Polydipsiesymptomatik, sowie unerklärbarer Gewichtsverlust
- Nüchtern-Plasmaglukose $\geq 7,0$ mmol/l (nüchtern bedeutet in diesem Fall eine Nahrungskarenz von mindestens 8 Stunden)
- Plasmaglukose $\geq 11,1$ mmol/l zwei Stunden nach einem oralen Glukosetoleranztest (oGTT) mit einer Glukosebelastung von 75 g Glukose

I.1.4 Epidemiologie

Von den geschätzten 200 Millionen Menschen mit Diabetes weltweit sind nur etwa 10% vom Typ 1 Diabetes betroffen, während der „Alters“-Diabetes mit 90% zur Massenerkrankung geworden ist und zwar vorwiegend in den industrialisierten Ländern. Betroffen sind vor allem Länder mit einem wachsenden Urbanisierungsgrad wie Indien (35,5 Millionen) und China (23,8 Millionen). Laut Statistik der „Internationalen Diabetes Federation“ (IDF), werden im Jahre 2025 weltweit 333 Millionen Menschen an Diabetes erkrankt sein (Diabetes Atlas, 2003).

Die Ursachen für die zunehmende Prävalenz des Typ 2 Diabetes, im Volksmund auch „Alterszucker“ genannt, liegen zum einen in der höheren Lebenserwartung einer kontinuierlich wachsenden Weltbevölkerung. Zum anderen steigt mit der zunehmend feststellbaren Bewegungsarmut und Obesitas (Wild et al., 2004), unter der immer öfter auch schon Jugendliche leiden, das Risiko an Diabetes zu erkranken. Eng mit der Obesitas ist das sogenannte Metabolische Syndrom verbunden (siehe auch Kapitel I.1.6), dessen Prävalenz auf 20-25% der Bevölkerung geschätzt wird (Dunstan et al., 2002) und welches ein hohes Risiko darstellt, an Typ

2 Diabetes zu erkranken. Die Gesundheitsgefährdung liegt vor allem in dem anfangs schleichenden und asymptomatischen Verlauf, so dass die meisten Menschen sich ihrer Erkrankung nicht bewusst sind. In dieser Phase können bereits Mikroangiopathien entstehen mit assoziierten Folgeschäden an Retina, Nieren und Nervensystem. So stellt Typ 2 Diabetes die häufigste Ursache für Erblindung bei über 25-Jährigen dar. Die klinische Manifestation der Erkrankung erfolgt, abgesehen von einigen Sonderformen, nicht vor dem 30. Lebensjahr.

I.1.5 Pathophysiologie

Beim Typ 2 Diabetes kommt es aufgrund einer eingeschränkten Wirksamkeit des Insulins im peripheren Gewebe (Insulinresistenz) und einer inadäquaten Sekretion zu einem Missverhältnis zwischen Insulinangebot und Insulinbedarf. Somit besteht bei dem Typ 2 Diabetiker ein relativer Insulinmangel im Gegensatz zum Typ 1 Diabetes, bei dem ein absoluter Insulinmangel herrscht. Von einem relativen Insulinmangel spricht man, wenn trotz gelegentlich normaler oder sogar leicht erhöhter Insulinkonzentrationen im Blut die metabolische Antwort des Organismus nicht ausreicht, um die Blutglukose zu senken (Pessin u. Saltiel, 2000). Da eine Substitution lebensnotwendig ist, wurde der Typ 1 Diabetes früher auch als insulinabhängiger, der Typ 2 Diabetes als nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus bezeichnet. Der Typ 2 Diabetes gilt als polyfaktorielle Erkrankung. Umweltfaktoren (Überflussernährung, Bewegungsarmut) haben zu einer deutlichen Zunahme der Prävalenz in den westlichen Ländern geführt. Eine erbliche Veranlagung ist jedoch neben diesen exogenen Faktoren eine wesentliche Voraussetzung für die Ausprägung des Krankheitsgeschehens (Kellerer u. Häring, 1999).

I.1.6 Pathogenese

Im Vordergrund der Entwicklung des Typ 2 Diabetes steht das gestörte Wechselspiel von Insulin zwischen den β -Zellen des Pankreas und den peripheren Zielgeweben (Leber, Skelettmuskel, Fettgewebe). Die Kausalität von Insulinresistenz gegenüber der Sekretionsanomalie wird seit Jahrzehnten kontrovers diskutiert. Ein ursprüngliches Vorliegen einer Insulinresistenz dürfte aber dennoch bei der Mehrzahl der Typ 2 Diabetes Fälle den Ausgangspunkt darstellen. Vieles spricht für eine Insulinresistenz des Skelettmuskels als primären Defekt (Warram et al., 1990).

Mit der Insulinresistenz eng verbunden ist der Grad an Fettleibigkeit, der ein wichtiges Pathogenitätsmerkmal darstellt (Kahn u. Flier, 2000). Während sich in den Industrienationen Diabetes und Adipositas (Obesitas) zur Volkskrankheit entwickeln, war der Typ 2 Diabetes zu Anfang des Jahrhunderts eine ausgesprochen seltene Erkrankung. Aufgrund dieser Beobachtungen stellte der amerikanische Genetiker James Neel die Hypothese des „sparsamen Genotyps“ auf. Die für die Entwicklung des metabolischen Syndroms verantwortlichen Gene bieten für das Überleben unter Mangelbedingungen einen erheblichen Selektionsvorteil. Daher hat sich die Schaffung vieler Fettdepots als Adaption an ein unregelmäßiges Nahrungsangebot im Laufe der Evolution bewährt, nicht jedoch unter einer hyperkalorischen Ernährungsweise in den zivilisierten Ländern (Neel, 1962). Nach Zahlen der IDF sind 80% aller Typ 2 Diabetiker adipös. Quantifizieren lässt sich der Grad an Obesitas mit dem sogenannten „Body Mass Index“ [BMI = Körpergewicht in Kilogramm / Körpergröße in Meter²], der mit dem Risiko an Typ 2 Diabetes zu erkranken korreliert. Die Verschlechterung der Insulinempfindlichkeit wird vor allem auf das abdominale Fettdepot zurückgeführt, da durch dessen hohe Lipolyserate die freien Fettsäuren (FFS) erhöht sind (Paolisso et al. 1995), die in der Pathogenese eine Schlüsselstellung einnehmen (Boden, 1997). In diesem Zusammenhang wurde von Unger der Begriff Lipotoxizität geprägt (Unger, 2002), um den Effekt chronisch erhöhter FFS auf die Insulinsekretion der β -Zellen zu beschreiben. Dabei ist weniger die adipozytäre Fettspeicherung als pathogen anzusehen, sondern vielmehr die ektopische Ablagerung in Leber, Muskel und β -Zellen. Bei insulinresistenten Individuen können vermehrt Lipidablagerungen in der Muskelzelle beobachtet werden (Kuhlmann et al., 2003), wobei Triglyceride (TG), Diglyceride und langkettige aktivierte Fettsäuren streng mit einem gestörten Glukosemetabolismus korrelieren

(Kelley u. Mandarino, 2000) und intrazellulär zu einer Störung der Signaltransduktion führen (Itani et al., 2002). In dem in dieser Arbeit verwendeten Tiermodell der Zucker Diabetic Fatty (ZDF)-Ratte, führen chronisch erhöhte FFS zu einer Störung der Insulinsekretion, aufgrund einer durch Apoptose bedingten Reduzierung der β -Zellmasse um mehr als 50% (Unger, 1997). So zeigten mehrere Forschergruppen, dass die chronische Fütterung einer fettreichen Diät zu einer gestörten Insulinsekretion führt (Kaiyala et al., 1999) und umgekehrt eine Reduktion der FFS im Plasma bei Typ 2 Diabetikern in einer Verbesserung der Insulinwirkung resultiert (Qvigstad et al., 2003).

Insulinresistenz und Adipositas sind oft vergesellschaftet mit Hypertonie und Dyslipoproteinämie (Brotman u. Girod, 2002). Dieses komplexe Krankheitsbild wird als Metabolisches Syndrom oder Syndrom X (Reaven, 1988) bezeichnet und bessert sich meist nach Gewichtsreduktion, so dass gelegentlich sogar die Behandlungsbedürftigkeit des Diabetes verschwindet. Aufgrund seiner Bedeutung als treibende Kraft für die Entwicklung von Typ 2 Diabetes und Herz-Kreislauf-Erkrankungen samt ihren Langzeitschäden wurde eine weltweit gültige Definition für das Metabolische Syndrom (IDF, 2005) festgelegt:

- Abdominale Obesitas (definiert als Taillenumfang ≥ 94 cm bei Männern bzw. ≥ 80 cm bei Frauen)

sowie 2 der folgenden 4 Faktoren:

- Triglycerid (TG)-Spiegel: $\geq 1,7$ mmol/l
- "High density lipoprotein" (HDL)-Cholesterin: $< 1,03$ mmol/l bei Männern bzw. $< 1,29$ mmol/l bei Frauen
- Blutdruck: systolisch ≥ 130 mm Hg oder diastolisch ≥ 85 mm Hg
- Nüchtern-Blutglukose: $\geq 5,6$ mmol/l oder diagnostizierter Typ 2 Diabetes

Nach der Definition des „National Cholesterol Education Program“ sind die o.g. Kriterien als Risikofaktoren (Grundy et al., 2004) für Herz-Kreislauf-Erkrankungen anzusehen, die inzwischen von großer klinischer Bedeutung sind.

Eine eher wissenschaftlich orientierte Definition, die jedoch spezielle Testverfahren notwendig macht, welche über die klinischen Routineanalysen hinausgehen, wurde von der WHO festgelegt (1999):

eines der aufgeführten Kriterien:

- Typ 2 Diabetes
- Gestörte Glukosetoleranz
- Insulinresistenz

sowie zwei der folgenden Faktoren:

- Bluthochdruck
- Obesitas
- Hypertriglyzeridämie oder niedrige HDL-Spiegel
- Mikroalbuminurie

Hyperurikämie, Gerinnungsneigung und Hyperleptinämie können Teil des Syndroms sein, sind jedoch nicht ausschlaggebend für die Definition.

Trotz der entstehenden Insulinresistenz bleibt die Glukosehomöostase aufgrund einer gesteigerten Insulinsekretion der pankreatischen β -Zellen zunächst normal (De Fronzo, 2004). Die Hyperinsulinämie kann als Kompensationsversuch zur Insulinresistenz verstanden werden, um den Defekt in der muskulären Glukoseaufnahme zu überwinden und die hepatische Glukoseproduktion auf Basalniveau zu halten. In dieser sogenannten prädiabetischen Phase, die über Jahre hinweg bestehen kann, bleibt die Blutglukose im Normbereich.

Verschlechtert sich die Insulinresistenz weiter, spricht man von einer gestörten Glukosetoleranz. Der manifeste Typ 2 Diabetes ist dann erreicht, wenn die Gegenregulation der Inselzellen nicht mehr ausreicht den erhöhten Bedarf an Insulin zu decken (Polonsky et al., 1996) und die Konzentration an Glukose im Blut trotz erhöhter Insulinausschüttung chronisch erhöht bleibt. Dass sich diese Entwicklung, angefangen von einer gestörten Glukosetoleranz bis hin zum manifesten Diabetes, in der obesen ZDF-Ratte binnen weniger Wochen vollzieht, macht sie zu einem interessanten Tiermodell im Studium des humanen Typ 2 Diabetes.

I.1.7 Blutglukosehomöostase

Da im Rahmen dieser Arbeit sowohl Tiere mit einem ungestörten als auch einem gestörten Glukosestoffwechsel verwendet wurden, wird zum besseren Verständnis deren Intermediärstoffwechsels (gehungert, Glukosebelastung) zunächst auf die Physiologie und Pathophysiologie eingegangen. Im Anschluss wird die Bedeutung des Pyruvatdehydrogenase (PDH)-Komplexes als zentrales Schlüsselenzym der Glukoseoxidation und als mögliches Ziel für pharmakologische Eingriffe aufgezeigt.

I.1.7.a Physiologie der Blutglukosehomöostase

Die Blutglukosekonzentration variiert trotz stoßweiser Nahrungszufuhr und Hungerperioden in den engen Grenzen zwischen 4-7 mmol/l. Dies garantiert eine ausreichend hohe Glukosekonzentration zur Versorgung des Zentralnervensystems (Schaaf u. Usadel, 1999). Die Blutglukosekonzentration wird beim Gesunden durch ein fein geregeltes, dynamisches Gleichgewicht zwischen glukoseverbrauchenden und glukoseliefernden Reaktionen gesteuert. Hormonelle Faktoren koordinieren diese Stoffwechselwege, dabei ist Insulin das entscheidende Regulatorhormon (Cook u. Taborsky, 1997) neben den kontra-insulinären Hormonen: Glukagon, den Katecholaminen, Wachstumshormonen und Cortisol. Die Insulinkonzentration spiegelt die Ernährungssituation wider. Ist die alimentäre Kohlenhydratzufuhr zu gering, oder fehlt sie vollständig, führt der fehlende Stimulus der Blutglukose zu einer Hemmung der Insulinsekretion und reziprok wird die Ausschüttung von Glukagon stimuliert (Löffler u. Petrides, 1997). Dadurch wird der Glukoseeinstrom in insulinsensitive Gewebe (Muskel- und Fettgewebe) vermindert und gleichzeitig Glykogenolyse und Glukoneogenese stimuliert. Der Hauptanteil der endogenen Glukoseproduktion stammt aus der Leber (ca. 85%) und in geringem Umfang auch aus der Niere (Ekberg et al., 1999). Von den Glykogenspeichern ist jedoch nur der in der Leber und Niere enthaltene Vorrat unmittelbar für die Aufrechterhaltung der Glukosekonzentration im Blut verfügbar, da nur diese über ausreichende Aktivitäten an Glukose-6-Phosphatase verfügen (Ferrannini u. De Fronzo, 2004). In der Muskulatur wird Glukose-6-Phosphat (G6P) in der Glykolyse verstoffwechselt bzw.

bei Muskularbeit unter anaeroben Bedingungen zu Laktat abgebaut, dieses gelangt auf dem Blutweg zur Leber, wo es zu Glukose resynthetisiert wird.

Die o.g. Zusammenhänge zwischen dem Glukosekohlenstoff der Muskelzelle und der Leber werden als Cori-Zyklus bezeichnet (Lehninger et al., 1993). Eine Variante dieses Kreislaufs liegt in der, im Verlauf der Glykolyse stattfindenden, Transaminierung von Pyruvat in die Aminosäure Alanin (Alanin-Zyklus). Auf diese Weise trägt auch das in der Muskelmasse enthaltene Glykogen indirekt zur Glukoseneubildung für den Organismus bei (Stryer, 1988).

Die Leber nimmt also im Hunger und bei Muskularbeit in der Blutglukosehomöostase eine zentrale Rolle als Energietransformator ein (Löffler u. Petrides, 1997), indem sie die als Glykogen gespeicherte bzw. die über die Glukoneogenese produzierte Glukose zur Versorgung peripherer Gewebe an das Blut abgibt und ihren eigenen Energiebedarf aus der Oxidation von FFS deckt.

Die Blutglukosekonzentration verändert sich bei Nahrungsaufnahme. Werden durch die Nahrung Kohlenhydrate aufgenommen, so steigt der Glukosespiegel an und daraufhin die Insulinkonzentration im Blut. Die Peripherie (Muskulatur, Fettgewebe) nimmt vermehrt Glukose auf und in der Leber werden die Glykogenspeicher aufgefüllt (De Fronzo, 1997).

1.1.7.b Pathophysiologie der Blutglukosehomöostase

Trotz des sehr heterogenen Krankheitsbildes des Typ 2 Diabetes liegt der Pathogenese der Hyperglykämie ein gemeinsamer Stoffwechselweg zugrunde.

Der Intermediärstoffwechsel beim Typ 2 Diabetes ist paradoxerweise auf Hunger „geschaltet“, obwohl ein Überflussangebot an Brennstoffen vorliegt. Dies ist jedoch nicht überraschend, wenn man bedenkt, dass Hunger und Typ 2 Diabetes Stoffwechselsituationen mit relativem Insulinmangel in Verbindung mit relativem Glukagonüberschuss sind. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde von Okar der Ausdruck „Hungern inmitten Überfluss“ geprägt (Okar, 2002).

Als Folge des Insulinmangels kommt es an der Muskulatur zu einem verminderten Glukosetransport (Holman u. Kasuga, 1997), die Muskelzelle verbraucht nun vermehrt FFS, die aufgrund der gesteigerten Lipolyse verstärkt angeboten werden (Hepp u. Häring, 1999). Die Regulation sowie die gegenseitigen

Beziehungen von Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel stehen in besonderem Maße unter dem Einfluss der FFS im Plasma. Am Herzmuskel und am Skelettmuskel beeinflussen sich der Stoffwechsel der FFS und der Glukose gegenseitig. Bereits 1963 entwickelte Randle das Konzept des „Glukose – Fettsäure Zyklus“, der einerseits durch die Hemmung der Glukoseoxidation im Muskel durch die FFS aus den TG-Speichern in Muskulatur und Fettgewebe und andererseits durch die Verminderung der Lipolyse infolge der Aufnahme von Glukose durch diese Gewebe gekennzeichnet ist (Randle, 1963). Durch diesen Zyklus ist ein substrat-kompetitiver Mechanismus gegeben, der unabhängig von der hormonellen Steuerung zu einer Konstanz der Glukosehomöostase beiträgt. Die gesteigerte Lipolyserate und Fettoxidation im Diabetes Typ 2 resultiert in einem Anstieg der Konzentration von Acetyl-CoA und Citrat, die auf zweifache Weise die Glykolyse hemmen. Acetyl-CoA hemmt die PDH, das Schlüsselenzym der Glukoseoxidation, und Citrat die Phosphofruktokinase, das Schlüsselenzym der Glykolyse; dadurch wird die Wiederverwendung von Laktat und Pyruvat in der Leber gefördert. In der Folge wird die Hexokinase durch ihr Substrat G6P, das nun akkumuliert, inhibiert und somit die Glukoseaufnahme in die Muskelzelle vermindert. Während dieses Konzept für die Hemmung der PDH noch heute gültig ist, werden nach neueren Erkenntnissen für den verminderten Glukosetransport die Coenzym A (CoA) aktivierten langkettigen Fettsäuren (LCA-CoA) verantwortlich gemacht. Diese hemmen die Hexokinase direkt (Thompson u. Cooney, 2000) und führen zu einer verminderten Translokation von Glukosetransportprotein (GLUT)-4 an die Zelloberfläche (Shulman, 2000). Letztere beruht auf einer durch die Serinkinasen vermittelten Beeinträchtigung der Signaltransduktion innerhalb der Insulinsignalkaskade.

Ausdruck der verminderten Insulinwirkung auf den Leberstoffwechsel ist die erhöhte Rate hepatischer Glukoseproduktion, die zu einem Überwiegen von Glykogenolyse und Glukoneogenese über die hepatische Glukoseaufnahme führt (De Fronzo et al., 1982) und sich nach nächtlicher Nahrungskarenz in erhöhten Nüchtern-Blutglukosespiegeln widerspiegelt. Die erhöhte Glukoneogeneserate wird durch die erhöhte Substratanflutung der Glukosevorstufen Laktat, Alanin und Glycerin (Gerich u. Nurjhan, 1993) gefördert. Der erhöhte Glukagonspiegel bewirkt zusätzlich eine verstärkte TG-Mobilisierung im Fettgewebe. Übertrifft das Angebot der FFS die Verbrennungskapazität der Leber, kommt es zu einer vermehrten Bildung von Ketonkörpern und zur gesteigerten Reveresterung in TG. Können diese

nicht adäquat als Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDL) ans Blut abgegeben werden, erfolgt die Speicherung in Form von Leberlipiden und es entsteht das klinische Bild der Fettleber (Stone u. van Thiel, 1985).

Aus der defizienten Insulinwirkung hinsichtlich der Glukoseaufnahme in periphere Gewebe und aus der verzögerten Suppression der hepatischen Glukoseproduktion, resultiert die postprandiale Hyperglykämie (Kahn u. Porte, 1997).

1.1.7.c Rolle des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes

Der mitochondriale Pyruvatdehydrogenase-Komplex katalysiert die irreversible dehydrierende Decarboxylierung von Pyruvat unter Bildung von Kohlendioxid (CO_2), Acetyl-CoA und NADH.

Unter gefütterten Bedingungen ist der Komplex enzymatisch aktiv und erzeugt Acetyl-CoA, das entweder im Krebs-Zyklus vollständig zu CO_2 und H_2O abgebaut wird oder als Substrat für die Fettsäuresynthese genutzt wird (Randle, 1986). Im gehungerten Zustand ist der Komplex inaktiv, um Pyruvat und Laktat für die Glukoneogenese aufzusparen (Randle, 1986). Der PDH-Komplex verbindet somit als Knotenpunkt die Glykolyse und den Citratzyklus (Harris et al., 2002) und fungiert als wichtiges Schlüsselenzym der Blutglukosehomöostase.

Der PDH-Multienzymkomplex (Abb. I-1) besteht aus 3 katalytischen Komponenten (E1, E2, E3) (Patel u. Korotchkina, 2001). Die Pyruvatdecarboxylase-einheit (E1) ist ein Tetramer der Zusammensetzung $\alpha_2\beta_2$ (Reed, 1974), das die geschwindigkeitsbestimmende Teilreaktion des Komplexes katalysiert, wobei Thiaminpyrophosphat (TPP) als Coenzym zur Decarboxylierung von Pyruvat und zur reduktiven Acetylierung der Lipoatgruppen (Lip-S_2) dient, die kovalent an die Lipotransacetylase (E2) gebunden sind. Der Acetylrest wird mit dem Coenzym A unter Bildung von Acetyl-CoA abgespalten. Die Dihydrolipoatdehydrogenase (E3) oxidiert die reduzierten Liponsäurereste ($\text{Lip-(SH}_2\text{)}$) von E2 unter Reduktion von Flavinadenindinukleotid (FAD), das an E3 gebunden ist, zu FADH_2 , das anschließend mit Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) als Redoxpartner wieder zu FAD reoxidiert wird. E3 ist in Eukaryoten über ein Bindungsprotein (BP) mit E2, die den Kern des Komplexes bildet, verbunden.

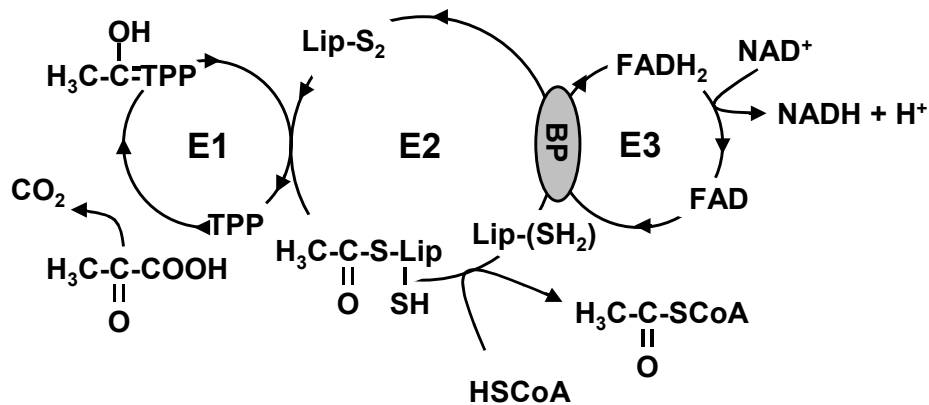


Abb. I-1: Schematischer Bau des PDH-Multienzymkomplexes und Ablauf der Gesamtreaktion, nach Patel und Korotchkina, 2003.

Die metabolische Weichenstellung des PDH-Komplexes zwischen Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel erfordert einen hohen Grad an Kontrolle.

Die Steuerung der PDH-Aktivität innerhalb von Minuten bis Stunden wird als Kurzzeitregulation bezeichnet und erfolgt durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung mittels spezifischer Proteinkinasen und Phosphatasen (Patel u. Korotchkina, 2001), die Bestandteil des Komplexes sind.

Von den Pyruvatdehydrogenasekinasen (PDK) gibt es 4 Isoformen (PDK1, PDK2, PDK3, PDK4), die in unterschiedlich hohen Proteinmengen gewebespezifisch vorkommen (Bowker-Kinley et al., 1998) und damit eine genaue, gewebeadaptierte Regulation erlauben.

Die Produkte der PDH-Reaktion selbst, und wichtiger noch, die der Oxidation von FFS und Ketonkörpern, NADH und Acetyl-CoA, sind positive Regulatoren der PDK-Aktivität (Roche et al., 2003), indem sie indirekt die Reduktion und Acetylierung der Lipoatreste von E2 beeinflussen. Deren Reduktionszustand erkennen die PDKs und werden dadurch allosterisch aktiviert. Negative Regulatoren der PDK-Aktivität sind Pyruvat und Adenosindiphosphat (ADP) (Roche et al., 2001), die die Kinasereaktion durch einen kompetitiven Mechanismus inhibieren. Somit bestimmt das NADH/NAD, Acetyl-CoA/CoA und Adenosintriphosphat (ATP)/ADP Verhältnis den Anteil der PDH, der in seiner aktiven (dephosphorylierten) Form vorliegt. Die PDH steht folglich unter dem indirekten Einfluss antilipolytischer und lipolytischer Hormonwirkungen und kann somit als eine Art Sensor des mitochondrialen Stoffwechsels (Energiebedarfs) bezeichnet werden (Patel u. Korotchkina, 2002).

Die PDK hemmen die PDH-Aktivität durch Phosphorylierung dreier Serinreste der E1 α Untereinheit (Korotchkina u. Patel, 2001a), wobei bereits nach Phosphorylierung von einem Serinrest die PDH-Reaktion zum Erliegen kommt.

Die kovalente Modifikation der Serinreste 1 und 2 verhindert die Interaktion des katalytischen Zentrums von E1 mit Pyruvat und der Lipoyldomäne von E2. Die Phosphorylierung des Serinrestes 3 behindert die Wechselwirkung von E1 mit TPP (Korotchkina u. Patel, 2001b).

Antagonistisch zu den PDK fungieren die Pyruvatdehydrogenase-Phosphatasen (PDP), die die Serinreste der PDH-E1 α Untereinheit dephosphorylieren und somit die Enzymaktivität wieder herstellen. Die Aktivität der Phosphatasen, von denen zwei Isoformen (PDP1, PDP2) existieren (Huang et al., 1998), werden einerseits durch erhöhte Konzentrationen von Mg²⁺ (PDP 1) und Ca²⁺ (PDP 2) stimuliert und andererseits hormonell durch Insulin, das über die Proteinkinase C δ die PDP phosphoryliert und somit aktiviert, gesteuert (Caruso et al., 2001).

Neben diesen o.g. kurzfristigen Kontrollmechanismen unterliegt der Komplex auch einer Langzeitregulation auf Ebene der PDK-Transkription (Abb. I-2). Für PDK2 und PDK4 konnte gezeigt werden, dass deren Proteinkonzentrationen in Abhängigkeit vom Fütterungsstatus und hormonellen Änderungen variieren (Harris et al., 2001).

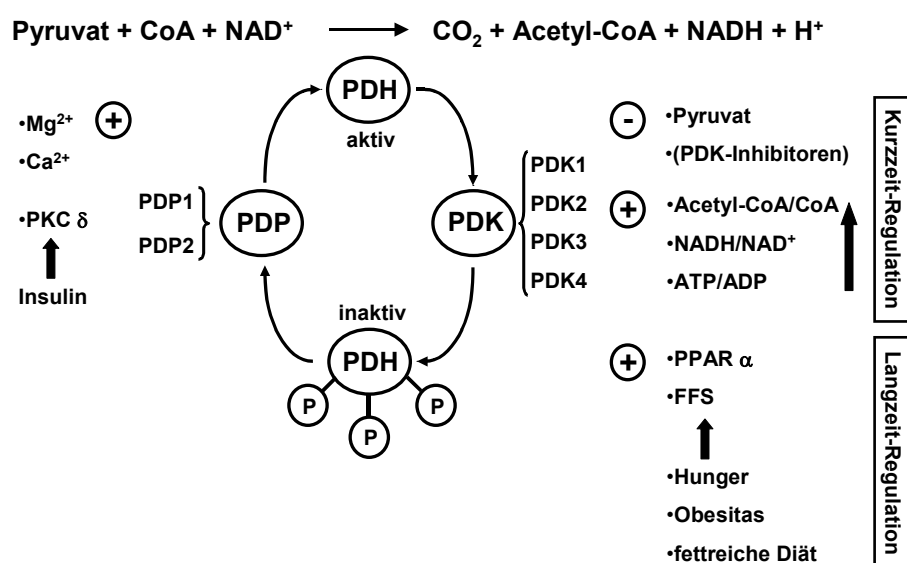


Abb. I-2: Reaktionsgleichung der Decarboxylierung von Pyruvat und Regulatoren des PDH-Enzymkomplexes.

Studien über die Regulation der PDH zeigen, dass im Hungerzustand, bei fettreicher Diät und im Diabetes mellitus die PDK in den meisten Geweben überexprimiert sind (Roche et al., 2001), wohingegen die PDP Aktivität in einigen Geweben erniedrigt ist (Huang et al., 2003) und in einer reduzierten Aktivität der PDH resultiert. Zwei der PDK Isoformen, PDK2 und PDK4, sind in hoher Konzentration in Herz-, Skelettmuskel und auch in der Leber enthalten. Von der PDK2 nimmt man an, dass sie additiv zur PDK4 arbeitet, wobei die PDK4 als Hauptregulator angesehen wird (Kwon u. Harris, 2004). Diese Isoform ist expressionell am stärksten reguliert und soll somit eine wichtige Rolle bei der Langzeitkontrolle der PDH spielen. Die zentrale Bedeutung der PDK4 lässt sich an PDK4 knock out Mäusen (Jeoung et al., 2002) zeigen, die nach einem Nahrungsentzug von 48 Stunden eine schwere und lebensbedrohliche Hypoglykämie entwickeln. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mit einem Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptor (PPAR) α Liganden der Effekt von Hungern und Diabetes auf die PDK4 Expression nachgeahmt werden kann (Harris et al., 2002); Wiederanfütterung und Insulingabe konnten die Reaktion rückgängig machen (Wu et al., 1999).

Durch Untersuchungen an PPAR α knock out Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese nukleären Hormonrezeptoren für die Expression der PDK4 notwendig sind (Wu et al., 2001). Somit stehen auch hier die FFS, die als natürliche Liganden der PPAR α angesehen werden (Forman et al., 1997), im Fokus der Pathobiochemie des PDH-Komplexes beim Diabetes mellitus Typ 2.

Bei längerer Nahrungskarenz, aber auch bei Tieren, die Winterschlaf halten (Buck et al., 2002), ist eine PDH Inaktivierung von entscheidender Bedeutung, um Glukose zu sparen und damit eine Hypoglykämie zu vermeiden. Eine Hemmung des PDH-Komplexes im Typ 2 Diabetes, der metabolisch eine Hungersituation widerspiegelt, wird jedoch zum Nachteil, da das Einsparen von Pyruvat (Laktat) als Glukoneogenesevorstufe zur Hyperglykämie beiträgt.

Somit spielen die PDK als Regulator der PDH eine Schlüsselrolle in der Kontrolle des Gleichgewichts zwischen Glukose- und Fettoxidation.

Neben der Regulation in peripheren Geweben spielt die PDH des Zentralen Nervensystems eine wichtige Rolle im Energiehaushalt der Neurone. Lam et al. (2005) stellten die Hypothese auf, dass der Fluss von Acetyl-CoA in den Krebs-

Zyklus als biochemischer „Glukose-Sensor“ im Hypothalamus fungiert, der seinerseits die Blutglukosespiegel und den Leberglukosestoffwechsel kontrolliert.

Folglich wäre eine Aktivierung der PDH (peripher, zentral) durch Hemmung der PDK ein effektiver Mechanismus, die Blutglukosehomöostase im Diabetes zu verbessern.

I.2 Pharmakologische Beeinflussung

Die Therapie des Diabetes Typ 2 basiert auf 2 Säulen, einer pharmakologischen und einer nicht-pharmakologischen Therapie. Neben dem pharmakologischen Trias aus Insulin(analoga), insulintropen und nicht-insulintropen Antidiabetika stellt eine Ernährungstherapie und sportliche Aktivität die Grundlage jeder Diabetes Behandlung dar (Laube u. Mehnert, 1999), um Normalgewicht zu erreichen und assoziierte Stoffwechselstörungen zu verbessern.

I.2.1 Insulin

Ziel der Insulintherapie ist es, bei nachlassender Sekretionsleistung der pankreatischen β -Zellen, das fehlende Insulin zu ersetzen und die physiologische Insulinsekretion des Nicht-Diabetikers zu simulieren (Rosak u. Böhm, 1999).

I.2.2 Sulfonylharnstoffe

Eine indirekte Steigerung der Insulinsekretion wird durch die pankreatisch wirksamen insulintropen Antidiabetika erreicht. Zu dieser Substanzklasse gehören die Sulfonylharnstoffe. Sie depolarisieren die β -Zelle über eine Verringerung der Permeabilität der Zellmembran für Kalium und öffnen spannungsabhängige Calciumkanäle. Der erhöhte Calciumeinstrom führt dann schließlich zu einer Stimulation der Exozytose des granulär gespeicherten Insulins (Henquin, 1990).

Sulfonylharnstoffe sind daher an die weitgehend intakte Biosynthese von Insulin gekoppelt.

I.2.3 α -Glukosidase-Hemmer

Diese Medikamente reduzieren die postprandiale Hyperglykämie auf der Ebene des Verdauungskanal. Der Mechanismus dieser Substanzklasse ist die kompetitive Hemmung der α -Glukosidase in den Mikrovilli der intestinalen Enterozyten (Bailey, 2004). Dadurch wird die Kohlenhydratverdauung verlangsamt und die Resorptionszeit verlängert.

I.2.4 Biguanide

Hauptvertreter dieser Pharmaka ist Metformin. Die Substanz reduziert die hepatische Glukoseproduktion, verbessert die Insulinresistenz und verzögert die enterale Glukoseresorption (Garber, 2004); der genaue Wirkmechanismus ist jedoch bisher nicht eindeutig geklärt. Die Aktivierung der Adenosinmonophosphat aktivierten Proteinkinase wird als potentieller Wirkort angenommen (Zhou et al., 2001).

I.2.5 PPAR-Agonisten

Neben den bisher beschriebenen „klassischen“ Antidiabetika stellen die PPAR-Agonisten eine relativ junge Substanzklasse dar. Die PPAR, von denen eine α (hauptsächlich in der Leber exprimiert), γ (Expression vornehmlich im Fettgewebe) und δ Form bekannt ist (Lemberger et al., 1996), gehören zur Superfamilie der nukleären Steroid-Rezeptoren. Den PPAR Agonisten gemeinsam ist ihre lipidsenkende Wirkung, die in einer verbesserten Insulinsensitivität resultiert, daher werden sie auch „Insulinsensitizer“ genannt, unterschiedlich ist nur ihr Wirkmechanismus. Während die PPAR α Agonisten (Fibrate) zu einer gesteigerten hepatischen β -Oxidation (Desvergne u. Wahli, 1999) bei gleichzeitiger Verminderung der Triglyceridsynthese führen, fördern die synthetischen PPAR γ Liganden (Thiazolidindione) eine Umverteilung von Fett aus ektopischen Depots in neu differenzierte, kleine Adipozyten mit einer größeren Fettspeicherungskapazität (De

Souza et al., 2001) und einer höheren Insulinempfindlichkeit, was jedoch mit einer potentiellen Gewichtszunahme verbunden ist.

I.2.6 PDK-Inhibitoren

Die Aktivierung der PDH durch eine Hemmung der PDK könnte ein neuer, möglicher therapeutischer Ansatz zur Behandlung der Hyperglykämie im Typ 2 Diabetes werden.

Mit einem Isoformen unspezifischen PDK-Inhibitor, Dichloroacetat (DCA), konnte eine blutglukose-senkende Wirkung bei Tieren und humanen Typ 2 Diabetikern (Stacpoole u. Greene, 1992), sowie eine Erhöhung des Respiratorischen Quotienten (RQ) gezeigt werden. DCA ist nach seiner chemischen Struktur ein Pyruvat analog (Mann et al., 2000) und gilt als Prototyp der PDK-Inhibitoren. Die Substanz ist jedoch wegen ihrer Toxizität als Therapeutikum ungeeignet und wird nur noch bei schweren Formen der Laktatazidose angewendet (Stacpoole, 1997). Zum Studium der pharmakologischen Aktivierung der PDH wurde DCA im Rahmen dieser Arbeit als Modellschubstanz verwendet.

Bei der Behandlung des Diabetes wird von isoformselektiven PDK-Inhibitoren ein Vorteil erwartet. Die Frage, welche PDK Isoform die geeignetste ist, bleibt aufgrund fehlender klinischer Daten offen.

Die PDK4 ist vornehmlich in Herz- und Skelettmuskel exprimiert (Patel u. Korotchkina, 2003). Eine PDH Aktivierung in diesen Geweben würde die Glukoseoxidation erhöhen und gleichzeitig das Angebot der Glukoneogenesevorstufen senken. Die Alternative wäre eine Hemmung der in der Leber dominierenden PDK2. Dies würde postprandial zu einer erhöhten Glukoseaufnahme und einer verminderten Glukoneogenese führen (Mayers et al., 2005).

Neueste Forschungsergebnisse zeigen, dass die PDK auch als zentrales Target eine wichtige Rolle spielen könnten. Die PDH-Aktivierung mit DCA steigert den Pyruvatfluss in Neurone und Astrozyten (Itoh et al., 2003). Die

Einleitung

intrahypothalamische Infusion von DCA senkte während einer euglykämischen Clampstudie bei Ratten die Blutglukose, erhöhte die Glukoseinfusionsrate und senkte die hepatische Glukoseproduktion (Lam et al., 2005). Diese zentrale Aktivierung resultierte jedoch nicht in einer gesteigerten Glukoseoxidation.

Wenn auch der Mechanismus der PDH-Aktivierung in peripheren Geweben und Neurone identisch ist, so beruht der Effekt der Blutglukosesenkung auf zwei völlig unterschiedlichen Stoffwechselwegen.

Für einen spezifischen PDK Inhibitor existiert derzeit noch keine Zulassung.

I.3 Oraler Glukosetoleranztest

Zum Studium der Blutglukosehomöostase wurde als Modell der oGTT verwendet.

Das Zusammenspiel der in 1.1.7.a geschilderten hormonellen Faktoren führt dazu, dass beim Gesunden Hypoglykämien vermieden werden und jede Steigerung der Blutglukosekonzentration auch durch exzessive alimentäre Zufuhr rasch abgefangen wird. Die Reaktion der Blutglukose ist dabei so zuverlässig, dass sie zur Grundlage von Suchtests nach Kohlenhydratstoffwechselstörungen in Form von Glukosetoleranztests gemacht wird, die die Einnahme einer kohlenhydratreichen Mahlzeit simulieren (Landgraf u. Haslbeck, 1999).

Nach Einnahme einer Glukoselösung kommt es zunächst zu einem raschen Anstieg der Blutglukose innerhalb der ersten 30 Minuten, wonach die Gegenregulation einsetzt und sich bis spätestens zwei Stunden nach Beginn der Belastung eine weitgehende Normalisierung einstellt. Bei Patienten mit Diabetes mellitus ist neben einem steileren Anstieg der Blutglukose in der ersten Phase v.a. der Abfall nach Ansetzen der Gegenregulation stark verzögert.

Wie zuvor in Kapitel I.1.3 geschildert, wird der oGTT als einer von drei möglichen diagnostischen Kriterien angesehen. Während der manifeste Diabetes bereits durch Kardinalsymptome wie Hyperglykämie und Polyurie erkennbar ist, kann das Stadium einer gestörten Glukosetoleranz (2-Stunden-Plasmaglukose nach oGTT: 7,8 - 11,1 mmol/l) nur mit Hilfe von Belastungsproben erkannt werden. Somit stellt dieser Provokationstest ein wichtiges Diagnostikum für eine Früherkennung des Diabetes mellitus dar und ist aufgrund seiner weltweiten Normierung ein wichtiges Hilfsmittel für epidemiologische Untersuchungen.

Für die Funktionsprobe gilt eine Testdosis von 75 g Glukose in 200-300 ml Flüssigkeit. Zusätzlich zum Nüchternwert erfolgen weitere Blutglukosebestimmungen aus dem Kapillarblut nach 60 und 120 Minuten (30, 90, 180 Minuten fakultativ). Die Messung der Testzeit beginnt, wenn der Proband die Glukoselösung zu trinken beginnt. Zur Durchführung des oGTT ist eine Nüchternperiode von mindestens 10 Stunden notwendig. Am Ende des Toleranztests kann eine Analyse des Urins auf Glukose erfolgen. Die Durchführung des oGTT im Tiermodell ist in Kapitel II.2.1. beschrieben.

Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Test dazu benutzt, den oxidativen und nicht-oxidativen Glukosestoffwechsel zu untersuchen, um aus den gesammelten Daten abschließend eine Bilanzierung über die Höhe des Anteils der applizierten Glukose an dem jeweiligen Stoffwechselweg erstellen zu können. Zudem kann mit dem Funktionstest die Entwicklung von der gestörten Glukosetoleranz bis zum manifesten Diabetes aufgezeigt werden.

Die applizierte Glukose unterliegt nach der Resorption zwei grundsätzlichen Stoffwechselwegen: sie wird oxidiert (Krebs-Zyklus, Pentosephosphatweg) und/oder nicht-oxidativ (freie Glukose, Glykogen) gespeichert (Abb. I-3).

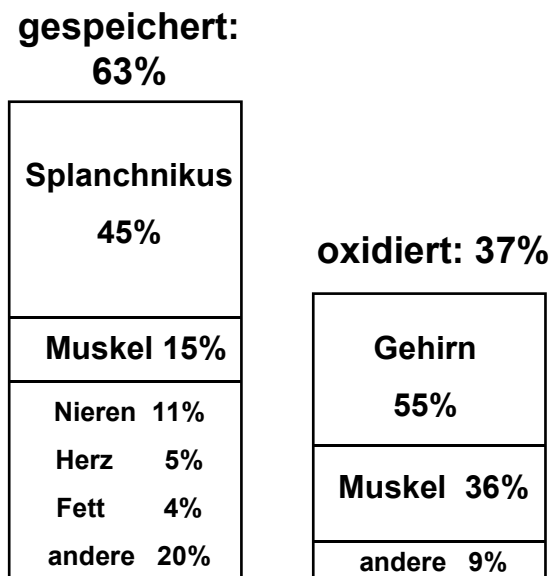


Abb. I-3: Überblick über das metabolische Schicksal oral applizierter Glukose beim gesunden Menschen, nach Kelley et al., 1988.

Auch wenn der oGTT als solches schon lange untersucht wurde, wird die Frage, ob die Leber den Hauptteil der Glukose aufnimmt oder nur eine minore Rolle spielt, kontrovers diskutiert.

Nach einer ersten postprandialen Verstoffwechslung im Magen- und Darmbereich gelangt die Glukose zur Leber. An der Leber fördert Insulin die Speicherung der Glukose durch Aktivierung der Glykogensynthese (Frame u. Cohen, 2001).

Glykogen wird über einen direkten Weg: Glukose → G6P → Glukose-1-Phosphat (G1P) → Uridindiphosphat (UDP)-Glukose → Glykogen und einen indirekten glukoneogenetischen Stoffwechselweg gebildet (Laktat, Pyruvat → G6P → G1P → UDP-Glukose → Glykogen); der Anteil der jeweiligen Stoffwechselwege ist gleich groß (Shulman u. Landau, 1992).

In Fett- und Muskelgewebe (Klip et al., 1987) fördert Insulin die Translokation der GLUT-4 zur Plasmamembran und stimuliert hierdurch den Glukosetransport. In der Muskulatur erfolgt die Glykogenspeicherung über den direkten Weg. Über die GLUT-1 und GLUT-3 Transporter gelangt die Glukose insulinunabhängig ins Gehirn. Unvollständig abgebaute Glukose (Erythrozyten, Nierenmark) gelangt über Laktat zurück in die Leber und wird dort wieder zu Glukose resynthetisiert. Die renale Ausscheidung erfolgt, wenn die Nierenschwelle (8,3-10,0 mmol/l) erreicht ist.

I.4 Ziele und Vorgehensweise

Der Fokus dieser Dissertation liegt in der Untersuchung des oxidativen- und nicht-oxidativen Glukosestoffwechsels unter besonderer Berücksichtigung der Aktivität des PDH-Komplexes am Tiermodell der Ratte.

Zu diesem Zweck wurden mehrere oGTT-Studien sowie pharmakologische Studien an insulin sensitiven, prädiabetischen und diabetischen Ratten durchgeführt.

I.4.1 Glukosemetabolismus während eines oGTT

Der oGTT als solches ist zwar schon lange bei der Ratte bekannt, jedoch wurde bisher nicht über einen Vergleich der Kohlenhydratoxidation (KHO) bei schlanken und obesen, 8 und 16 Wochen alten ZDF-Ratten berichtet.

Ziel dieser Studien war es, den Stoffwechsel von akut angebotener Glukose zu verfolgen. Da die Glukoseintoleranz aus einer verminderten Glukoseverstoffwechslung resultiert, ist das Studium der Defekte im oxidativen und nicht-oxidativen Glukosestoffwechsel für das Verständnis der Pathophysiologie dieses Tiermodells von großer Bedeutung.

Dabei wurde die Glukoseoxidation über die Atemgasanalyse bestimmt und der Anteil der gespeicherten Glukose (Glykogen) in Leber und Muskulatur ermittelt.

Der große Vorteil der indirekten Kalorimetrie liegt in der nicht-invasiven Anwendung und der Reproduzierbarkeit dieser Methode. Bei der Messung der Glukoseoxidation besteht im Vergleich zur Isotopendilutionsmethode keine zeitliche Verzögerung, die für die Verdünnung der Isotopen notwendig ist.

Daneben wurden anhand klinisch-chemischer Parameter die schnellen Veränderungen im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel nach Glukosebelastung demonstriert.

Weitere experimentelle Studien galten der Analyse biochemischer Parameter.

Bislang unerforscht blieben Untersuchungen zur Änderung der PDH-Aktivität während eines oGTT. Aussagen über den Aktivitätszustand der PDH werden meist nur indirekt über die Western- oder Northern-Blotting-Analyse der PDK oder PDP gemacht, ohne die Aktivität des Enzym-Komplexes zu bestimmen. Um die Regulation des PDH-Enzymkomplexes während einer oralen Glukosebelastung zu

studieren, wurde die PDH-Aktivität aus dem Leber- und Muskelgewebe zu definierten Zeitpunkten gemessen.

Die Regulation der PDK4-Proteinmenge unter den o.g. Versuchsbedingungen ist ebenfalls unbekannt. Versuchsdaten beschränken sich entweder auf längere Zeiträume oder die Analyse der messenger Ribonukleinsäure (mRNS) dieses Isoenzym. Die Expression der PDK4 wurde bei den ZDF-Ratten im Grundzustand (gefüttert vs. gehungert, schlank vs. obese) sowie während des oGTT mittels Western-Blotting-Analyse untersucht.

Ergänzt wurden die Untersuchungen mit der Bestimmung der PDH-E1 α/β Enzymmenge bei schlanken und obesen ZDF-Ratten. Die Regulation dieser Untereinheit ist bei diesem Tiermodell nicht erforscht.

I.4.2 Pharmakologische Beeinflussung der Aktivität des PDH-Komplexes

Die Wirkung von DCA auf die Glukoseoxidation wurde seit der Entdeckung der Substanz bereits mehrfach beschrieben. Untersuchungen über Unterschiede zwischen insulinsensitiven und diabetischen Ratten, unmittelbar nach einer akuten DCA-Applikation, konnten bis heute allerdings nicht demonstriert werden. Im Rahmen der pharmakologischen Studien wurde der Effekt dieses unspezifischen PDK-Inhibitors auf die PDH-Aktivität und die Glukoseoxidation untersucht.

I.5 Strukturierung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in vier Teile gegliedert.

In den ersten drei Teilen werden die Untersuchungen des Glukosestoffwechsels während eines oGTT an verschiedenen Tierkollektiven gezeigt: insulinresistente Wistar Ratten, 8 Wochen alte, prädiabetische und 16 Wochen alte, diabetische ZDF-Ratten.

Bei jeder Studiengruppe werden die Veränderungen nach der oralen Glukosebelastung anhand klinisch-chemischer Parameter im Blut (Glukose, Insulin, Laktat, FFS, TG, Ketonkörper, Cholesterin), in Leber und Muskel (Glykogen, G6P, Fruktose-6-Phosphat (F6P), ATP, sowie Leber-TG) und mit Daten aus der Atemgasanalyse (RQ, KHO und Fettoxidation (FO)) dargestellt. Im Anschluss erfolgt für jede Versuchsgruppe eine Bilanzierung der applizierten Glukosemenge.

Bei den ZDF-Ratten folgt diesem Abschnitt ein weiterer Block, in dem durch ex vivo Analysen von biochemischen Parametern (PDH-Aktivität, Proteinmenge von PDK4, PDK2 und PDH-E1 α/β) die Kurz- und Langzeitregulation des PDH-Enzymkomplexes beschrieben wird.

In einer abschließenden pharmakologischen Studie wird der Effekt des unspezifischen PDK-Inhibitors DCA auf die Glukoseoxidation und die PDH-Aktivität bei Wistar- und ZDF-Ratten aufgezeigt.

II Material und Methoden

II.1 Versuchstiere

II.1.1 Tierstämme

Für die Experimente wurden männliche Wistar-Ratten im Alter von 8 bis 16 Wochen, sowie männliche schlanke und obese ZDF-Ratten im Alter von 8 bis 20 Wochen verwendet.

II.1.1.a Wistar-Ratte

Die Wildform dieser Tiere stellt die aus Zentralasien stammende braune Wanderratte (*Rattus norvegicus*) dar. Aus speziellen Züchtungslinien domestizierter Albino-Varianten wurde Anfang des 20. Jahrhunderts an der Universität von Pennsylvania die Wistar Ratte als standardisiertes Labortier gezüchtet.

Der verwendete Stamm [HsdCpb:WU] wurde von der Firma Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen. Um einen möglichst hohen Heterozygotiegrad zu erhalten, werden die Tiere in Form eines Auszuchtssystems verpaart.

II.1.1.b Zucker Diabetic Fatty (ZDF)-Ratte

Die ZDF-Ratte spielt als häufig genutztes Tiermodell zur Erforschung des humanen Typ 2 Diabetes in seiner Ausbildung, Verlauf und Symptomatik eine wichtige Rolle.

1961 erforschten die beiden Wissenschaftler Lois M. Zucker und Theodore F. Zucker ein Gen in einem obesen Rattenstamm, einer Kreuzung von Sherman und Merck Stock M Ratten, das für die Ausbildung der Fettleibigkeit codiert. Sie bezeichneten als erste dieses Allel als „fatty“ (fa)-Gen, während das Wildtypallel als (Fa) bezeichnet wird (Zucker u. Zucker, 1961). Die Tiere wurden nach ihnen Zucker Fatty (ZF)-Ratten benannt. In dem heute auch als Lep^{fa} bezeichneten Gen wird durch eine Punktmutation (Austausch von Glutamin 269 gegen Prolin; Iida et al, 1996) eine defekte extrazelluläre Leptin Rezeptor Domäne codiert.

Von dieser Kolonie wurden in anderen Labors einige männliche, obese Tiere spontan diabetisch. Diese Mutanten wurden von Dr. Richard Peterson an der Indiana University Medical School selektiert und gezielt auf dieses Merkmal ingezüchtet. Diese Zuchtlinie wurde unter dem Namen Zucker Diabetic Fatty (ZDF)-Ratte 1985 etabliert.

Phänotypisch zeigen die ZDF-Ratten einen auf weißer Grundfarbe schwarzen Rückenstreifen sowie einen schwarzen Kopf.

Genotypisch liegen unabhängig voneinander autosomal rezessiv vererbte Mutationen auf zwei verschiedenen Genen zugrunde:

Zum einen der auf den genetischen ZF-Hintergrund zurückzuführende *fa*-Locus, zum anderen ein auf einem separaten Gen liegender pankreatischer β -Zell-Genexpressionsdefekt im Insulin Gen Promotor, der zu reduzierten Insulin mRNA Spiegeln führt (Griffen et al., 2001). Dieser liegt sowohl bei obesen als auch bei schlanken Tieren vor, wird jedoch bei letzteren posttranskriptional kompensiert. Diese Kompensation gewährleistet ein adäquates Insulinangebot unter normalen Bedingungen, aber wenn die periphere Insulinresistenz den Insulinbedarf steigert, kann die Insulintranskriptionsrate limitierend werden und in einer relativen Insulindefizienz und Hyperglykämie resultieren (Griffen et al., 2001).

Der defekte Leptinrezeptor verursacht eine hormonelle Dysregulation, indem das von den Fettzellen gebildete Hormon Leptin zwar bindet, aber keine Phosphorylierung der intrazellulären Rezeptordomäne bewirkt und somit die Signaltransduktion unterbleibt (Unger, 1997). Folglich wird vom Hypothalamus kontinuierlich ein „Hunger“-Signal gesendet, das als treibende Kraft die Tiere permanent zur Hyperphagie motiviert und folglich ein massives viszerales Fettdepot angelegt wird.

Nur die Kombination aus β -Zell-Defekt und Obesitas mit resultierender Insulinresistenz mündet in einem overt Diabetes (Griffen et al., 2001). In dieser Beziehung ist das ZDF-Tiermodell ähnlich zum klassischen humanen Typ 2 Diabetes.

Männliche ZDF-Tiere mit zwei *fa*-Allelen entwickeln einen Diabetes, im Gegensatz zu ZF-Ratten, die aufgrund einer kompensatorischen Hyperinsulinämie zeitlebens normoglykämisch bleiben. Die Manifestation des Diabetes erfolgt sukzessiv alters- und gewichtsabhängig von einer hyperinsulinämischen, euglykämischen Stoffwechsellage hin zu einem hyperglykämischen Zustand mit

einer relativen Insulindefizienz ab einem Lebensalter von etwa 12 Wochen. Desweiteren zeigt sich eine Hyperlipidämie als metabolische Veränderung.

Der homozygot dominante Wildtyp (Fa/Fa) und die heterozygoten Tiere (Fa/fa) sind deutlich kleiner als die fa/fa-Tiere und unterscheiden sich phänotypisch nicht voneinander. Sie sind schlank und insulinsensitiv. Die schlanken Geschwisterkollektive (Fa/?) wurden im Rahmen dieser Arbeit als Kontrolltiere verwendet.

Die verwendeten Stämme [ZDF/Gmi-fa/fa] und [ZDF/Gmi-Fa/?] wurden von Charles River Laboratories (Wilmington, USA) bezogen.

II.1.2 Haltung der Tiere

Die Versuchstiere wurden gruppenweise bis zu vier Tieren auf Birkenholzgranulat (Typ HBK 1500/3000, Faserstoff-Werke J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg) in Makrolonkäfigen (Größe 4) gehalten. Die Käfige sind durch Kunststoff-Schiebevorhänge separiert, um eine Kreuzkontamination durch Allergene zwischen Mensch und Tier zu vermeiden. Für einen temporären Nahrungsentzug wurden Metallroste in die Käfige eingelegt, die so beschaffen sind, dass die Tiere keinen Zugang zur Einstreu hatten und eine Koprophagie verhindert wurde. Die Käfige waren je mit einem roten Rattentunnel (Firma PLEXX, Niederlande), einem Nagerholz (Scanbur BK, Dänemark) und Nestbaumaterial (TAPVEY, Finnland) angereichert. Alle Haltungssysteme wurden von der Firma Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg bezogen. Das Raumklima wurde mit 20° bis 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% bis 55% bei 16-facher Luftumwälzung pro Stunde konstant gehalten. Die Steuerung der Hell-Dunkel-Phasen wechselte in 12-stündigem Rhythmus (Hell-Phasen von 06:00-18:00 Uhr).

II.1.3 Fütterung der Tiere

Die Tiere wurden ad libitum mit „R/M-H Alleindiät für Ratten und Mäuse – Haltung“ (Pelletgröße 10 mm) der Firma ssniff® Spezialdiäten GmbH (Soest, Deutschland) gefüttert. Das Futter bestand aus 19% Rohprotein, 3% Rohfett, 5,2% Rohfaser und 6,7% Rohasche. Die Versuchstiere hatten stets freien Zugang zu Trinkwasser.

II.2 Methoden

II.2.1 in vivo Methoden

II.2.1.a oGTT intraindividuell - Blutglukoseprofil

Bei diesem einfachen, in der Arbeit als intraindividuell bezeichneten oGTT, wurde innerhalb eines Kollektivs überprüft, wie gut eine orale Glukosebelastung, abhängig von Alter und Stoffwechselsituation der Versuchstiere, toleriert wurde. Um den Verlauf der Blutglukose (Blutglukoseprofil) zu studieren, wurde den Tieren zu definierten Zeitpunkten jeweils eine Blutprobe entnommen.

Zur Untersuchung der Dosis- und Zeitabhängigkeit einer oralen Glukoselast wurde zunächst ein oGTT mit einer Menge von ½, 1 und 2 g Glukose (Glucosteril® 20%, Glukose Monohydrat, Fresenius Deutschland GmbH, Bad Homburg) pro kg Körpermasse (KM) (10 ml/kg KM per os (p.o.)) bei 16 Wochen alten, männlichen Wistar Ratten [HsdCpb:WU] (n=8) durchgeführt.

Aufgrund der Ergebnisse dieses Vorversuchs wurden für alle weiteren oGTT Studien bei den schlanken [ZDF/Gmi-Fa/?] und obesen [ZDF/Gmi-fa/fa], 8 und 16 Wochen alten, männlichen ZDF-Ratten eine Dosis von 2 g/kg KM p.o. gewählt. Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe betrug stets n=8. Als Kontrolle wurde die Gruppe ohne Glukosebelastung bezeichnet (NaCl 0,9%, 10 ml/kg KM p.o.). Die per os Applikationen wurden mit „Acufirm-Knopfkanülen“ (2x80 mm) der Firma Heiland, Hamburg durchgeführt.

Die Ratten wurden über Nacht in Hungerkäfige gesetzt, nach einem Nahrungsentzug von 18 h gewogen und p.o. appliziert. Nach Applikation hatten die Tiere weiterhin freien Zugang zu Trinkwasser, die Nahrungsrestriktion blieb bis Versuchsende bestehen. Als Zeitpunkte für die Blutentnahmen wurden stets 0, 30, 60, 90, 120 und 180 min nach Applikation gewählt.

Zu diesen Zeitpunkten erfolgte eine Blutentnahme aus der inzisierten Schwanzspitze (Einmal-Mikropipetten BLAUBRAND®, volumenbegrenzt, Firma Brand). Für die Glukosebestimmung wurden je 5 µl Vollblut in einer Kapillare aufgesogen, in einer Digitoninlösung (100 mg Digitonin, 100 mg Maleinimid, ad 1000 ml aqua bidest, beide Merck, Darmstadt) 1:50 verdünnt, geschüttelt und bis zur weiteren Analytik bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt.

II.2.1.b oGTT intraindividuell – Indirekte Kalorimetrie

Im Vordergrund dieser Studie steht die Untersuchung des oxidativen Glukosestoffwechsels anhand einer kontinuierlichen Messung der Atemgase Sauerstoff (O₂) und Kohlendioxid nach der oralen Glukosebelastung.

Das Verhältnis von CO₂-Abgabe zur O₂-Aufnahme (mol CO₂ / mol O₂) wird als Respiratorischer Quotient (RQ) bezeichnet. Da der oxidative Abbau der einzelnen Nährstofftypen schrittweise nach einer im Prinzip bekannten Stöchiometrie erfolgt, kann man dem Abbau von Glukose und Fettsäuren jeweils bestimmte Anteile an der Kohlendioxidproduktion und dem Sauerstoffverbrauch zuordnen (Noack, 1995). Somit spiegelt der RQ die Stoffwechselsituation wider. Bei der Glukoseverbrennung wird genauso viel CO₂ frei wie an O₂ verbraucht wird (Ulmer, 1997), somit gilt für die Kohlenhydratverbrennung ein RQ von 1,00 (Abb. II-1, A).

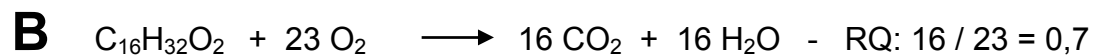
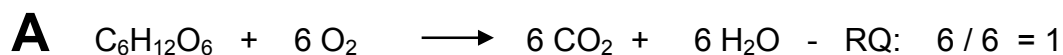


Abb. II-1 Oxidativer Abbau von Glukose (**A**) und Stöchiometrie des oxidativen Abbaus von Fettsäuren am Beispiel der Palmitinsäure (**B**) mit dem jeweils berechneten RQ.

Da die Fettsäuren pro Atom Kohlenstoff weniger Sauerstoff enthalten als die Kohlenhydrate, ergibt sich beim Abbau ein signifikant niedrigerer RQ von 0,70 (Abb. II-1, B).

Material und Methoden

Der RQ in Abhängigkeit unterschiedlicher Kohlenhydrat-Lipid-Mischungen zeigt die Tabelle II-1 exemplarisch.

Tabelle II-1 RQ beim oxidativen Abbau von unterschiedlichen Kohlenhydrat-Lipid-Mischungen in der Nahrung (aus Heldmaier u. Neuweiler, 2004)

Anteil der Kohlenhydrate (%)	Anteil der Lipide (%)	RQ mol CO ₂ / mol O ₂
100	0	1,00
60	40	0,80
0	100	0,71

Die Bestimmung des Stoffumsatzes über die Atemgasanalyse ermöglicht weiterhin eine Abschätzung, wie viele Kohlenhydrate und Fette oxidiert werden (Frenz, 1994). Die Berechnung der KHO und der FO erfolgte nach den in Kapitel II.4.1.c angegebenen Formeln.

Die Abb. II-2, A zeigt den Sauerstoffverbrauch und die Kohlendioxidproduktion bei beginnender Nahrungskarenz. Aus dem Verhältnis dieser Atemgase errechnet sich der RQ (Abb II-2, B).

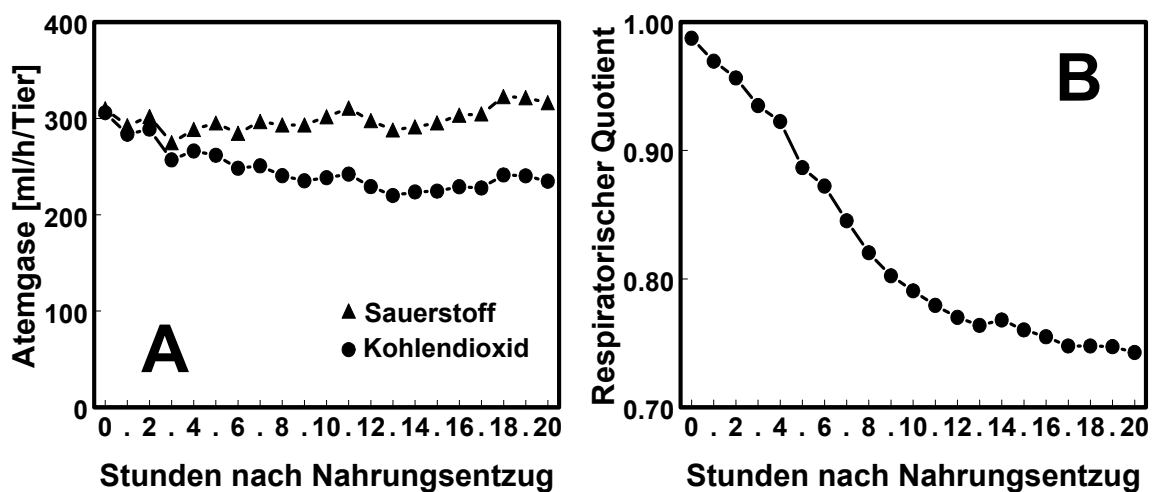


Abb. II-2 Verlauf der Atemgase bei 8 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten nach Nahrungsentzug (A) mit entsprechender Berechnung des RQ (B). Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=7-8 (bei der Darstellung sind die Fehlerbalken kleiner als die verwendeten Symbole).

Die Abb. II-3 zeigt, wie während der Hungerphase die KHO fällt und reziprok der Anteil der FO steigt.

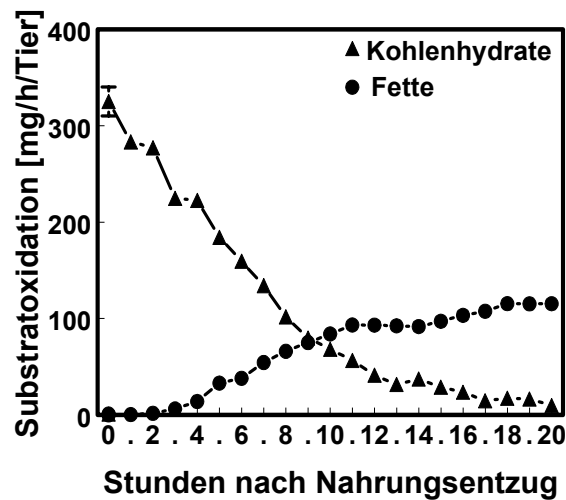


Abb. II-3 Verlauf der Kohlenhydrat- und Fettoxidation bei 8 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten nach Nahrungsentzug. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=7-8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole). Berechnung siehe Kapitel II.4.1.c.

Für die indirekte Kalorimetrie-Bestimmung erfolgte eine Einzelhaltung in individuell belüfteten Käfigen [Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg; Modell: individually ventilated cages (IVC)]; diese sind mit einem Mikrofilter und selbstschließenden Ventilen im Zuluft- sowie im Abluftstrang ausgestattet. In einer Klimakammer der Firma WEISS Umwelttechnik GmbH, Reiskirchen, befanden sich insgesamt 16 dieser Käfige: 7 Käfige (Kontrollgruppe: Tiere ohne Glukosebelastung bzw. ohne Behandlung), 8 Käfige (Tiere mit Glukosebelastung bzw. behandelte Gruppe) und ein leerer Käfig als Referenz. Temperatur, Luftfeuchte und Lichtzyklus entsprachen der allgemeinen Haltung. In einem Zeitdurchlauf von 16 min wurde jeder Käfig computergesteuert für eine Minute frequentiert, dabei wurde in der Luft der zunehmende Kohlendioxidgehalt und der abnehmende Sauerstoffgehalt vor Eintritt und nach Austritt aus den Käfigen gemessen. Die Bestimmung der Meßkomponenten erfolgte in einem Analysator der Firma ABB Automation Products GmbH, Frankfurt. Sauerstoff-Analysatormodul: „Magnos 16“, Messbereich O_2 : 19-21 Volumenprozent (Vol.%) (paramagnetische Messung), Kohlendioxid-Modul: „Uras 14“, Messbereich CO_2 : 0-10000 ppm (Infrarotmessung). Die Daten wurden mit der software von Dr. Guido Haschke, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, erfasst und ausgewertet.

Bei der Durchführung der Versuche wurden die Ratten bereits am Vortag einzeln in die Klimakammer-Käfige gesetzt und über Nacht gehungert (18 h), damit sich die Tiere bis zum Versuchsbeginn an die geänderten Haltungsbedingungen akklimatisieren konnten.

Um Schwankungen der Atemgase beim Öffnen der Käfige zu minimieren, wurden die Käfige jeweils nach der aktuellen Messung entnommen, so dass sich bis zur nächsten Atemgasanalyse ($t=16$ min) das Gasgemisch wieder normalisieren konnte. Nach Applikation wurden die Käfige sofort in die Klimakammer zurückgestellt; bei fortbestehender Nahrungsrestriktion und freiem Zugang zu Trinkwasser wurden die Atemgase über einen Zeitraum von 6 Stunden analysiert.

Aus den gemessenen Sauerstoff- und Kohlendioxidvolumina wurde der RQ berechnet, sowie die Kohlenhydrat- und Fettoxidation geschätzt.

II.2.1.c oGTT intraindividuell – renaler Glukoseverlust

Ziel dieser Studie war es, die über die Nieren ausgeschiedene Glukosemenge nach der oralen Glukosebelastung zu bestimmen.

Da auch hier eine den Versuchstieren fremde Haltung notwendig war, wurden die Ratten bereits am Vortag einzeln in die Stoffwechselkäfige (Tecniplast GmbH) gesetzt. Diese Diuresekäfige erlauben eine getrennte Sammlung von Kot und Urin. Der Urin wurde über einen Zeitraum von 6 Stunden nach Applikation unterhalb des eigentlichen Käfigs in einem Messzylinder aufgefangen und quantifiziert. Die Glukose wurde im Urin gemessen.

II.2.1.d oGTT interindividuell

Der Zweck dieses Versuchsaufbaus lag darin, den nicht-oxidativen Glukosefluss nach einer oralen Glukosebelastung in die Kompartimente Leber und Muskel zu verfolgen, daneben sollte die Bestimmung klinisch, chemischer (II.3), sowie biochemischer (II.2.2, II.2.3) Parameter die schnelle Stoffwechselregulation innerhalb des Intermediärstoffwechsels aufzeigen.

Als Versuchstiere wurden nun mehrere Kollektive gewählt, wobei zu den Zeitpunkten 0, (30), 60, 120 und 180 min nach Glukosegabe bei je einer Satellitengruppe (n=8) eine Blut- und Organentnahme erfolgte. Die Durchführung der Blutentnahme sowie der Glukosebestimmung entsprach der in Kapitel II.2.1.a beschriebenen Vorgehensweise. Im Falle von Laktat wurden 20 µl Blut in einer Kapillare aufgenommen und in 200 µl 0,6 M Perchlorsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) überführt, bis zum Zentrifugieren (10 min bei 4°C und 11300 g; Biofuge15, Heraeus Instruments Hanau) auf Eis gestellt und der klare Überstand zur Bestimmung aliquotiert. Alle restlichen Blutparameter (TG, FFS, Cholesterin, Ketonkörper und Insulin) wurden aus retroorbital entnommenem Blut bestimmt, dafür wurden die Tiere in einem halboffenen Narkosesystem (Isofluran-Verdampfer: Titus, Vapor 2000, Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck) mit Narkosemaske anästhesiert. Als Anästhetikum wurde 3,5 Vol.% Isofluran (Baxter, Unterschleißheim) in einem Gemisch aus O₂/Distickstoffmonoxid (N₂O) im Verhältnis 1:2 gewählt. Die Punktion erfolgte mit einer 25 µl Einmal-Mikropipette, wobei ca. 8 ml Blut in einem 15 ml Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) aufgefangen wurden. Nach ca. 30 min Standzeit bei RT wurden die Serumproben abzentrifugiert (10 min bei 4°C und 2000 g) und der Überstand zur weiteren Analyse pipettiert.

Die Organentnahme erfolgte im Anschluß an die retroorbitale Blutentnahme (weiterhin unter Narkose). Dafür wurde die Bauchhöhle mit einer chirurgischen Schere (Chirurgische Instrumente: Aesculap, Tuttlingen) eröffnet, und die Tiere wurden durch terminalen Blutentzug aus der Aorta abdominalis getötet. Unverzüglich wurde die Leber in toto isoliert, mit einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Zange der große Leberlappen schockgefroren, abgeschnitten und in flüssigen Stickstoff überführt. Für die Muskelentnahme (Mm. gastrocnemii) wurde der entsprechende Hautbereich mit der Schere inzisiert, die Haut stumpf abpräpariert und der dargestellte Muskel von umgebendem Fettgewebe isoliert. Bei der Entnahme wurde nur der Muskelbauch herausgetrennt; die sehnigen Anteile im Bereich des Ursprungs und Ansatzes verblieben am Knochen. Bei der Skelettmuskelentnahme wurden stets beide Anteile der Wadenmuskeln entnommen (Mm. gastrocnemii). Die entnommenen Muskeln wurden ebenfalls mit einer vorgekühlten Zange schockgefroren und sofort in flüssigen Stickstoff überführt. Alle Organe wurden nach vollzogenem Schockgefrieren gewogen und bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt.

Aus dem Leber- und Muskelgewebe wurden Glykogen, ATP, G6P, F6P und die PDH-Aktivität bestimmt, sowie PDK4, PDK2 und PDH E1 α/β mittels Western-Blot-Analyse. Im Falle der Leber wurden zusätzlich die TG und freie Glukose quantifiziert.

II.2.1.e *Akuter Effekt einer ein- und zweimaligen DCA Behandlung auf die PDH-Aktivität und die Glukoseoxidation*

Als Versuchstiere wurden 18 Wochen alte, männliche schlanke [ZDF/Gmi-Fa/?] und obese [ZDF/Gmi-fa/fa] ZDF-Ratten verwendet. Die mittlere Körpermasse betrug 347 ± 4 g bei den schlanken bzw. 352 ± 9 g bei den obesen ZDF-Ratten. Das Kollektiv wurde in je drei Gruppen (n=8) aufgeteilt und für 18 Stunden gehungert. Nach der nächtlichen Nahrungskarenz wurde eine Gruppe (DCA 1x) mit einer DCA Dosis von 500 mg/kg KM p.o. behandelt (t=0 h), eine weitere Gruppe (DCA 2x) erhielt die gleiche DCA Dosis zusätzlich am Vortag zum Zeitpunkt des Nahrungsentzugs (t= - 18 h: 1. Applikation, t=0 h: 2. Applikation). Die dritte Gruppe bildete die unbehandelte Kontrolle (NaCl 0,9%, 10 ml/kg KM). Über einen Zeitraum von vier Stunden (freier Zugang zu Trinkwasser, Nahrungsrestriktion) wurde den Tieren zur Bestimmung von Blutglukose und Laktat aus der Schwanzspitze stündlich Blut entnommen. Am Ende des Versuchs wurden nach terminaler Blutentnahme die Leber und die Mm. gastrocnemii entnommen, um damit anschließend Glykogen und die PDH-Aktivität zu bestimmen. Die Blut- und Organentnahme entsprach der in Kapitel II.2.1.d beschriebenen Vorgehensweise.

II.2.1.f *Akuter Effekt einer einmaligen DCA Behandlung auf das Blutglukoseprofil, die Kohlenhydrat- und Fettoxidation*

In dieser Studie wurde erneut der akute Effekt von DCA auf die Glukosehomöostase untersucht, jedoch wurde der Versuchszeitraum auf acht Stunden ausgedehnt.

Als Versuchstiere wurden 8 Wochen alte, männliche Wistar Ratten [HsdCpb:WU] und 18 Wochen alte, männliche obese [ZDF/Gmi-fa/fa] ZDF-Ratten verwendet. Die mittlere Körpermasse betrug 271 ± 3 g bei den Wistar Ratten bzw. 362 ± 20 g bei den obesen ZDF-Ratten. Die Ratten wurden einzeln in IVC-Käfige

gesetzt und über Nacht in der Klimakammer gehungert (18 h). Nach der nächtlichen Nahrungskarenz wurde je eine Gruppe (n=8) mit einer DCA Dosis von 500 mg/kg KM p.o. behandelt, die zweite Gruppe (n=7) bildete die unbehandelte Kontrolle (NaCl 0,9%, 10 ml/kg KM). Nach Applikation wurden die Käfige sofort in die Klimakammer zurückgestellt und über einen Zeitraum von acht Stunden (freier Zugang zu Trinkwasser, Nahrungsrestriktion) die Atemgase bestimmt.

Mit dem gleichen Tierkollektiv wurde der Versuch eine Woche später wiederholt, als Parameter wurde nun die Blutglukose bestimmt. Dazu wurde den Tieren stündlich aus der Schwanzspitze Blut entnommen. Am Ende des Versuchs wurde nach terminaler Blutentnahme die Leber zur Analyse von Glykogen entnommen.

II.2.2 in vitro Methoden

II.2.2.a Messung der PDH-Aktivität ex vivo

Probenaufarbeitung:

Zur Gewebeaufarbeitung wurde ein Stück gefrorenes Gewebe (Leber: 50 mg bzw. Muskel: 100 mg) jeweils in 2 ml Homogenisierungspuffer mittels Ultra-Turrax und Potter dispergiert. Das Organhomogenat wurde durch Gefriertauen (drei Zyklen) in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Anschließend wurde die Suspension in der Kühlzentrifuge für 10 min bei 600 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen, für Proteinbestimmung und Aktivitätstest aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Vollständige Aktivierung der PDH:

Zur Messung der Gesamtaktivität der PDH im Gewebehomogenat wurde diese mit der lambda Protein Phosphatase (λ -PPase) vollständig dephosphoryliert. Zu diesem Zweck wurden 100 μ g Gewebehomogenat mit 1 μ l λ -PPase (400 units), 10 μ l 20 mmol/l MnCl_2 , 10 μ l λ -PPase Puffer (10x) versetzt, auf 100 μ l mit Homogenisierungspuffer aufgefüllt und für 30 min im Wasserbad (37°C) inkubiert.

[1-¹⁴C]-Pyruvat – Test

Das Prinzip dieses Tests ist die Bestimmung der Enzymaktivität über den Substratumsatz. Die PDH setzt dabei das zugegebene, radioaktiv markierte [1-¹⁴C]-Pyruvat zu ¹⁴CO₂ um, das in den getränkten Filterpapieren fixiert wird.

Da pro mol gebildetes Kohlendioxid ein mol Pyruvat umgesetzt wird, ist der Substratumsatz proportional der PDH-Aktivität. Versuchsaufbau siehe Abb. II-4.



Abb. II-4 Darstellung des Reaktionsgefäßes mit Seitenöffnung, Eindrückstopfen mit gefaltetem Filterpapier, durch Stahlstecknadel befestigt.

Durchführung:

In jedes Röhrchen wurde mit einem heißen Dorn ein Loch im Durchmesser einer Pipettenspitze gestanzt, die scharfen Kanten wurden mit einer feinen Feile geglättet und mit einem Klebestreifen verschlossen.

Das Reaktionsgemisch und Lösung b wurden frisch angesetzt und im Wasserbad (37°C) angewärmt. Die mit einer Stahlstecknadel an den Eindrückstopfen befestigten, gefalteten Filterpapiere wurden mit 100 µl Hyaminhydroxid beträufelt. Die Gewebehomogenate wurden nach dem Auftauen im Wasserbad angewärmt und ein eingefrorenes Aliquot [1-¹⁴C]-Pyruvat bei Raumtemperatur aufgetaut. In jedes Röhrchen wurde je 69 µl Reaktionsgemisch und 10 µl Lösung b einpipettiert, Gewebehomogenat bzw. Enzym (mit Ausnahme der Kontrolle) zugegeben, mit

Homogenisierungspuffer auf 99 µl aufgefüllt und in einem Gestell für 2 min im Wasserbad (37°C) vorinkubiert. Im Turnus von 30 s wurde je 1 µl des radioaktiven Pyruvates direkt auf den Boden jedes Röhrchens einpipettiert, das Röhrchen mit dem vorbereiteten Eindrückstopfen verschlossen und die Zeit protokolliert. Die Reaktion wurde nach der jeweiligen Inkubation (15-30 min) im Wasserbad durch Zugabe von Trichloressigsäure über die seitliche Öffnung abgestoppt und das Loch mit Klebestreifen versiegelt. Nach Abstoppen der Reaktion verblieben die Röhrchen für eine Stunde im Wasserbad, damit sich das entweichende CO₂ im Filterpapier fängt. Danach wurden die Filterpapiere in je ein Szintillator-Röhrchen mit 8 ml Szintillatorflüssigkeit inkubiert, für 30 min geschüttelt und nach einer Standzeit von 60 min im Counter ausgezählt.

Lösungen und Puffer:

Homogenisierungspuffer (pH 7,4) mit Proteaseinhibitor (1 Tablette pro 10 ml):

80 mmol/l KCl, 50 mmol/l 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS), 40 mmol/l NaF, 2 mmol/l MgCl₂, 0,5 mmol/l Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

Reaktionsgemisch:

72,5 mmol/l Phosphatpuffer (pH 7,5), 21,7 mmol/l KOx, 2,9 mmol/l MgCl₂, Phosphotransacetylase (1,5 U/ml), 3,1 mmol/l NAD

Lösung b: 8 mmol/l DDT, 1 mmol/l TPP, 6,5 mmol/l CoA

Substrat: 50 mmol/l [1-¹⁴C] Pyruvat (100000 cpm/µl)

20% Trichloressigsäure, 30 mmol/l Pyruvat

Lambda Protein Phosphatase (λ-PPase, 400000 U/ml); 10x λ-PPase Puffer (pH 7,5):
50 mmol/l Tris, 0,1 mmol/l EDTA, 5 mmol/l 1,4-Dithiothreitol (DTT); New England Biolabs, Schwalbach

Material und Methoden

Verbrauchsmaterialien und Geräte:

Dispensiergerät	UltraTurraxT25, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen Potter S; B. Braun, Melsungen
Eindrückstopfen	55.466, Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier	Durchmesser 2 cm, Nagel & Co., Düren
Hyaminhydroxid	ZINSSER ANALYTIC, Frankfurt
Liquid Scintillation Counter	Wallac 1414 Winspectral, PerkinElmer
Proteaseinhibitor	complete Mini, EDTA-free Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pyruvat (9,00 MBq/mg)	Amersham Biosciences UK limited
Röhrchen	11,5 ml, 100 x 15,7 mm (55.466); Sarstedt, Nümbrecht
Szintillatorflüssigkeit	Rotiszint eco plus, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Szintillator-Röhrchen	polyethylene vials, 20 ml; Perkin Elmer, Groningen
Zentrifuge	Rotanta/TRC; Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Jede Versuchsreihe wurde als Doppelbestimmung durchgeführt; dabei lief bei jeder Reihe ein Reaktionsansatz ohne Homogenat (Kontrolle) und ein Ansatz mit 0,1 µl isoliertem PDH-Komplex (Pyruvatdehydrogenase, pig heart; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) als Positivkontrolle mit. Die Ergebnisse ergeben sich als Differenz aus den gemessenen Werten und Kontrolle. Die Enzymaktivität wurde in mU/mg Homogenat angegeben [mU: 1 nmol Substratumsatz pro min]. Die Stammlösung (Pyruvat 50 mmol/l) enthielt 100000 cpm/µl, somit betrug die spezifische Radioaktivität im Versuchsansatz (Pyruvat 0,5 mmol/l) 2000 cpm/nmol Pyruvat. Die Berechnung ist in der Tabelle II-2 exemplarisch aufgezeigt.

Beispielrechnung:

Tabelle II-2 Die Tabelle zeigt die Berechnung der spezifischen PDH-Aktivität [mU/mg] ausgehend von den Messwerten in cpm.

Inkubation	Protein-Menge	Messwert [cpm]	Kontrolle [cpm]	Ergebnis [cpm]	Pyruvat Umsatz	Pyruvat Umsatz / min
10 min	100 µg	12000	2000	10000	5 nmol	0,5 nmol/min
$0,5 \text{ nmol/min} = 0,5 \text{ nmol/min}/100 \text{ µg} = 5 \text{ nmol/min/mg} = 5 \text{ mU}$						

Um zu prüfen, in welchem Zeitfenster die Reaktionen linear sind, wurde eine Inkubation mit einer Verdünnungsreihe am isolierten PDH-Komplex (Abb. II-5) und den Organhomogenaten (Abb. II-6) durchgeführt.

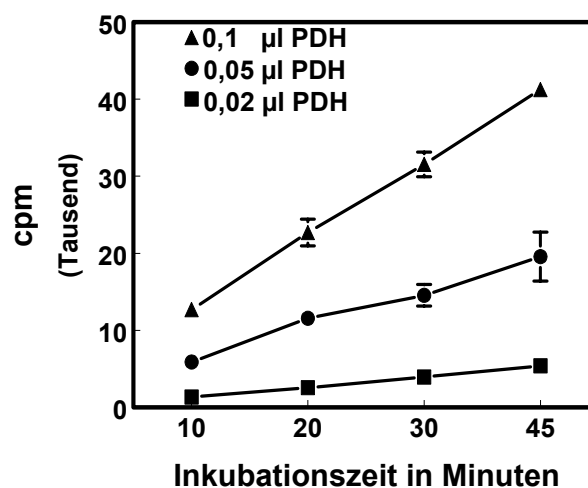


Abb. II-5 Verdünnungsreihe mit isoliertem PDH-Komplex. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$; $r \geq 0,98$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

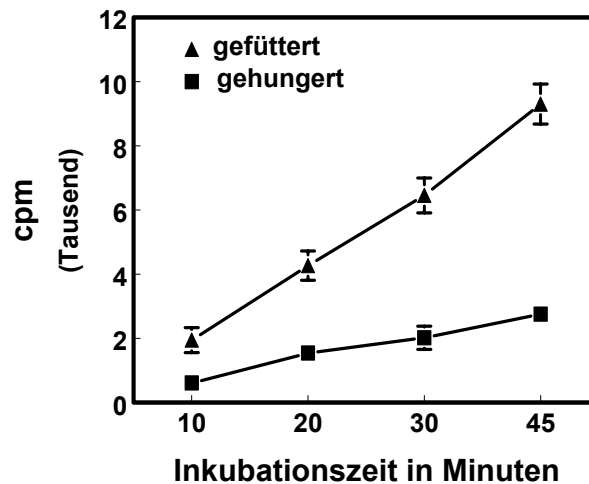


Abb. II-6 Inkubation von 100 μ g Leberhomogenat einer 16 Wochen alten, obesen ZDF-Ratte, gefüttert versus (vs.) gehungert. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$; $r \geq 0,97$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Aufgrund dieser Vorversuche zeigte sich bei einer Inkubationszeit von 10 bis 45 Minuten sowohl für die Positivkontrolle als auch für die Gewebe ein linearer Substratumsatz. Je nach Anzahl der Proben wurde daher ein Zeitraum von 20 bis 30 Minuten für die Inkubation gewählt.

In einem weiteren Vorversuch wurde geklärt, ob zwischen Probenmenge und Inkubationszeit ebenfalls ein linearer Zusammenhang besteht (Abb. II-7).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Enzymaktivität jeweils proportional abnahm, wenn man ein Viertel der Proteinmenge zugab bzw. die Inkubationszeit um den Faktor 4 reduzierte. Zwischen dem ausgewählten Zeitfenster und der verwendeten Proteinmenge bestand somit ebenfalls ein linearer Zusammenhang.

Für die Experimente wurden daher 0,1 μ l isolierter PDH-Komplex (Positivkontrolle) und 100 μ g Organhomogenat eingesetzt.

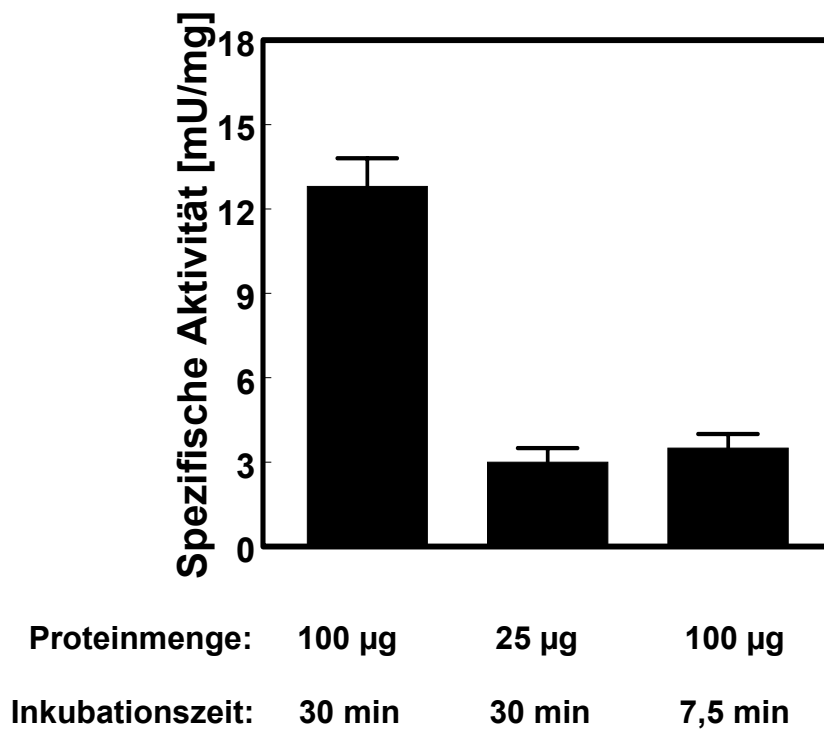


Abb. II-7 Inkubation von total aktiviertem Leberhomogenat einer gehungerten, 16 Wochen alten, obesen ZDF-Ratte. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=6.

II.2.3 Proteinbiochemische Methoden

II.2.3.a Mitochondrienpräparation, Dichtegradienten-Zonenzentrifugation

Für die Bestimmung der PDK4 bzw. PDK2 wurden 600 mg Gewebe (Leber, Muskel) in 5 ml Puffer I aufgetaut, mit einer Schere mechanisch zerkleinert und mit einem Ultra Turrax (Leber: 15 s, Muskel: 30 s, bei 24000 rpm) und Potter (je 30 s bei 14000 rpm) dispergiert. Das Homogenat wurde für 10 min bei 4°C und 400 g zentrifugiert, um den Zelldetritus und nicht aufgebrochene Zellen zu separieren. Der abgenommene Überstand wurde anschließend bei 4°C für 10 min mit 30000 g zentrifugiert. Im folgenden Waschvorgang wurde das entstandene Pellet vom Überstand getrennt und in Puffer I mit einem Glasstab resuspendiert und nochmals mit 30000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 2 ml Puffer II aufgeschwemmt und aliquotiert. Nach anschließendem Aufschluß durch Ultraschallbehandlung für wenige Sekunden wurden die Proben bis zur weiteren Analyse bei –20°C gelagert. Die Behandlung der Proben erfolgte stets unter Eiskühlung.

Puffer I (pH 7,4): 0,25 M Saccharose, 10 mmol/l Tris, 2 mmol/l EDTA, 2 mmol/l DTT

Puffer II: (pH 7,4): 0,25 M Saccharose, 10 mmol/l Tris, 2 mmol/l EDTA

Zentrifuge: Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments

II.2.3.b Proteinbestimmung

Die Quantifizierung erfolgte mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Assay, einer Kombination aus Biuret-Methode mit BCA als Detektionssystem (Smith et al., 1985). Zunächst kommt es hierbei in alkalischer Lösung zur Komplexbildung der Protein-Peptidbindung mit Cu²⁺-Ionen (Biuret-Reaktion). Die komplexierten Kupfer(II)-Ionen werden zu Kupfer(I) reduziert, welche spezifisch mit BCA einen violetten Farbkomplex bilden, der bei dem Absorptionsmaximum von 562 nm detektiert wird. Im Vergleich wurde die Extinktion einer Kalibrierreihe mit Rinder-Serumalbumin (BSA) bekannter Konzentrationen (0 bis 2000 µg/ml) bestimmt.

Zur Bestimmung der Konzentration einer Proteinprobe wurden 25 µl der unverdünnten BSA-Standardreihe bzw. 25 µl Probe (Verdünnung 1:5 bis 1:10) in eine 96 Loch Flachboden-Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend 200 µl des BCA-Reagenz (BCA-Protein Assay Kit, Pierce) hinzugegeben und gemischt. Dabei wurde stets eine Doppelbestimmung durchgeführt, um mögliche Messfehler auszuschließen. Nach einer 90-minütigen Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 562 nm gemessen (Spectra Max Plus, Molecular Devices) und die Proteinmenge anhand der Kalibriergeraden berechnet.

II.2.3.c Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Molekularbestimmung wurde die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) in Gegenwart von Sodiumdodecylsulfat (SDS) verwendet. Vor der eigentlichen Denaturierung erfolgte eine Reduktion der Disulfidbrücken in den Polypeptidketten durch DTT. Die Proteine binden das anionische Detergens SDS, wobei die hydrophoben intramolekularen Wechselwirkungen, die deren räumliche Struktur (Tertiär- und Quartärstruktur) bewirken, verloren gehen. In den so linearisierten Proteinen überdeckt die stark negativ geladene Seife SDS deren Eigenladung und es entstehen SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis. Diese Micellen unterscheiden sich damit nur noch in ihrer Größe und wandern im elektrischen Feld zum Plus-Pol. Zur Auftrennung wurde polymerisiertes Acrylamid (durch N,N'-Methylenbisacrylamid quervernetzt) benutzt, das je nach Monomerkonzentration ein mehr oder weniger dichtes dreidimensionales Netzwerk bildet. Für die Versuche wurden Bis-Tris Gele 4-12 % (Invitrogen) benutzt; die Gele besitzen ein 4-prozentiges Sammelgel und ein Trenngel, das in Form eines Gradientengels gegossen ist. Während der Wanderung im elektrischen Feld bleiben in den engen Maschen der Matrix, wie in einem Sieb, größere Moleküle zurück, wohingegen kleinere Proteinmoleküle schneller wandern. Dadurch erhält man klar voneinander abgegrenzte Proteinbanden.

Material und Methoden

Zur Probenvorbereitung wurden 30-50 µg Protein aus Zelllysaten mit 25 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 Minuten bei 75°C erhitzt. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Banden wurde stets ein Standard mit Proteinen bekannter Konzentration und Molekularmasse in einer Parallelspur aufgetragen. Pro Kammer wurden 12 µl denaturiertes Lysat zugegeben und in einem MOPS-SDS Laufpuffer bei 150 Volt für ca. 60 Minuten getrennt. Nach Laufende wurde das Gel für mindestens 3 min in Kathodenpuffer (siehe II.2.3.d) zum anschließenden Blotten überführt.

Verwendete Standardproteine:

PDK4	Prof. Dr. M.S. Patel, Department of Biochemistry, New York State University, Buffalo, NY, USA
Protein Marker	MagicMark™ Western Protein Standard, Invitrogen

Puffer:

Laufpuffer	20 x NuPAGE MOPS SDS Running Buffer, Invitrogen
SDS-Puffer	4x NuPAGE LDS Sample Buffer, Invitrogen

Geräte:

SDS-PAGE Kammern	Novex, Invitrogen Life Technologies
Spannungsgerät	Programmierbares High Voltage Power Pack PP4000, Biometra

II.2.3.d Western-Blot

Beim Western-Blot werden Proteine elektrophoretisch auf eine Membran übertragen, die dort detektiert und quantifiziert werden können. Als Membran wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran benutzt. Die Blotmembran (6x9 cm) wurde etwa 5 min vor Ende der Elektrophorese 30 s in Methanol äquilibriert und dann 10 min in Anodenpuffer II geschwenkt. Die Blotkammer ist eine Halbtrockenzelle, zwischen deren Elektroden die Proteine vertikal vom Gel auf die Membran transferiert werden.

Der Western-Blot wurde wie in der Abb. II-8 beschrieben, aufgebaut:

Auf der unteren Elektrode (Anode): 3 Filterpapiere (Anoden-Puffer I), 2 Filterpapiere (Anoden-Puffer II), darauf Membran und Gel gebettet und zur Kathode 5 Filterpapiere mit Kathodenpuffer.

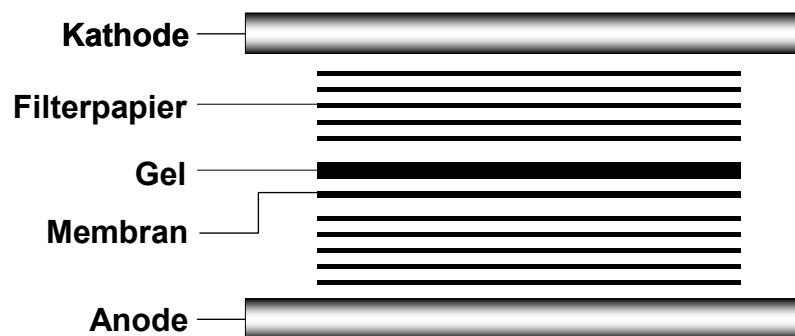


Abb. II-8 Schematische Darstellung des Western Blot Verfahrens.

Die getränkten Filterpapiere wurden jeweils unter leichtem Druck gewalzt, um Luftblasen zwischen Membran und Gel zu vermeiden. Das Blotten erfolgte für 2 Gele ca. 1 Stunde bei 450 Volt. Nach Blotende wurde die Membran entnommen, in eine Schale mit 50 ml Blockierlösung transferiert und für mindestens 1 h bei RT geschwenkt. Dabei wurden die restlichen, unspezifischen Proteinbindungsstellen der Blotmembran abgedeckt (geblockt), damit dort im Anschluß nicht die Nachweisantikörper binden können.

Lösungen:

Blotting-Puffer:

- Anode I: 0,3 M Tris / 10% Methanol
- Anode II: 25 mmol/l Tris / 10% Methanol
- Kathode: 40 mmol/l Aminohexansäure / 0,05% SDS / 10% Methanol

Waschpuffer: TBS (Sigma) / 0,05% Tween (Sigma)

Blockier-Lösung: TBS / 0,05% Tween / 3% Magermilchpulver bzw. 2% BSA

Acrylamidgele	NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel, 1.5 mm, 15 well
Lumi-Imager	Boeringer Ingelheim GmbH
PVDF Membran	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Western-Blot Apparatur	Invitrogen

II.2.3.e Rehybridisieren von Western-Blots

Um den gleichen Blot für den Nachweis anderer fixierter Proteine mit weiteren Antikörpern nutzen zu können, wurden die an die Membran gebundenen Antikörper durch Denaturierung entfernt. Hierfür wurde die Membran 5 min in Waschpuffer geschwenkt und anschließend in „Stripping-Lösung“ für 15 min bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Reinigungsschritt in Waschpuffer wurde die Membran in Blocking-Puffer überführt und für mindestens 1 h bei RT geschwenkt. Die darauffolgenden Arbeitsschritte entsprachen denen der Immunfärbung.

Stripping-Lösung: WESTERN BLOT Recycling Kit (Alpha Diagnostic International)

II.2.3.f Antikörperfärbung

Der Nachweis der relevanten Proteine auf der Membran erfolgte als indirekte Markierung. Nach Bindung eines antigenspezifischen, unmarkierten Primärantikörpers an spezifischen Epitopen auf den geblotteten Proteinen erfolgte die Detektion mit einem zweiten speziesspezifischen, markierten Sekundärantikörper (Abb II-9). Die primären Antikörper wurden in den entsprechenden Verdünnungen in 15 ml Blocking-Puffer verdünnt und der Blot darin über Nacht im Kühlschrank bei 4°C rolliert (Roller Mixer SRT1, Stuart Scientific). Am Folgetag wurde die Membran bei RT in vier Zyklen von je 10 min in einem Schälchen mit Waschpuffer geschwenkt. Nach dem Waschen wurde die Blot-Membran in ein 50 ml Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) mit 15 ml der Sekundärantikörper-Verdünnung überführt und für 1 h bei RT inkubiert.

Primäre Antikörper:

- Goat polyclonal anti-PDK2 (N-20): sc-14484, 200 µg IgG/ml; Western-Blot-Analyse: 1:100-1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- Goat polyclonal anti-PDK4 (C-16): sc-14495, 200 µg IgG/ml; Western-Blot-Analyse: 1:100-1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.
- Rabbit polyclonal anti-PDC-E1α/β, Western-Blot-Analyse: 1:10000; Prof. Dr. M.S. Patel, Department of Biochemistry, New York State University, Buffalo, NY, USA

Sekundäre Antikörper:

- Donkey anti-goat IgG-HRP, 100 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Western-Blotting: 1:10000
- Goat anti-rabbit IgG-HRP, 100 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Western-Blotting: 1:10000

Material und Methoden

Durch den mit Meerrettichperoxidase konjugierten Sekundärantikörper wird die Bindung indirekt visualisiert. Bei der Nachweisreaktion katalysiert das gekoppelte Enzym die Oxidation von Luminol und löst damit eine Chemolumineszenz aus. Das in der ECL (enhanced chemiluminescence)-Reaktion emittierte Licht wird in einem Lumineszenz-Meßgerät detektiert und sichtbar gemacht.

Nach der Sekundärantikörper-Inkubation wurde der Blot wieder 4 x 10 min in Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die Membran auf ein Tablett gelegt, mit 1 ml LumiLight^{Plus}-Substrat benetzt und für 5 min inkubiert. Der Blot wurde sofort luftblasenfrei zwischen zwei Folien gelegt, die Chemolumineszenz in einem Lumineszenz-Meßgerät (Lumi-ImagerTM, Boeringer) visualisiert, anschließend quantifiziert (software LumiAnalyst 3.0, Roche) und in „Boeringer light units“ (BLU) pro mg Protein angegeben.

Chemolumineszenz-Verstärker (ECL)-Lösung: LumiLight^{Plus}-Reagenz (Roche)

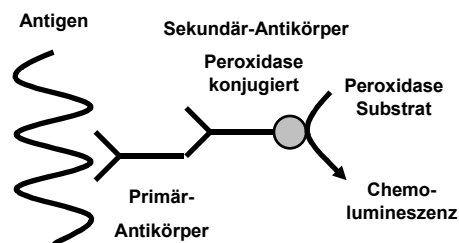


Abb. II-9 Schematische Darstellung der Detektion geblotteter Proteine.

II.3 Klinisch chemische Analytik

Die Insulinbestimmung sowie die Analyse sämtlicher klinischer Stoffwechselfparameter (sowohl Blut- als auch Organparameter) erfolgten in den Analysenlabors der Sanofi-Aventis Deutschland GmbH.

II.3.1 Bestimmung der Stoffwechselfparameter im Blut/Serum

Alle quantitativen in vitro Bestimmungen (mit Ausnahme des Insulins) wurden mittels Testkits (s.u.) für den Analysenautomaten Hitachi 912, Boeringer, Mannheim, durchgeführt.

II.3.1.a Glukose

Die Analyse erfolgte mit dem Test-Kit „Gluco-Quant[®]“.

II.3.1.b Laktat

Die Analyse erfolgte mit dem Test-Kit „L-Lactat“.

Beiden Tests liegt eine photometrische Methode zugrunde.

II.3.1.c Insulin

Die Insulinbestimmung erfolgte mittels Radioimmunoassay (RIA) mit dem „Sensitive Rat Insulin Ria Kit“.

II.3.1.d Cholesterin

Cholesterin wurde mit dem „Cholesterin CHOD-PAP“ in vitro-Test quantifiziert.

II.3.1.e Triglyceride

Die Analyse der TG erfolgte mit dem „TG GPO-PAP“ Test-Kit.

II.3.1.f Freie Fettsäuren

Die Bestimmung der FFS erfolgte mit dem „NEFA C“ Test.

Bei den o.g. Test-Kits handelte es sich jeweils um enzymatische Farbttests.

II.3.1.g Ketonkörper

Die Ketonkörperanalyse basiert auf einem photometrischen Messprinzip. Mit dem „Autokit Total Ketone Bodies“ wurden die Gesamt-Ketonkörper als Summe aus Acetoacetat und 3-Hydroxybutyrat ermittelt.

Testkits:

Autokit Total Ketone Bodies	Wako Chemicals GmbH, Neuss
Cholesterin CHOD-PAP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Gluco Quant®	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
L-Lactat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
NEFA C	Wako Chemicals GmbH, Neuss
Sensitive Rat Insulin Ria Kit	Linco Research Inc., St. Charles, USA
TG GPO-PAP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

II.3.2 Bestimmung der Stoffwechselfparameter in Leber und Skelettmuskulatur

II.3.2.a Organaufarbeitung

Für die in II.3.2.b und c genannten Analysen wurde folgende Aufarbeitung durchgeführt: Es wurde jeweils ein Leber- bzw. Muskelstück von ca. 1 g in ein mit 5 ml Perchlorsäure (Kühlschranktemperatur) gefülltes Röhrchen gegeben und nach dem Auftauen mit dem Ultra-Turrax (Leber: 15 s, Muskel: 30 s, 24000 rpm) dispergiert (Röhrchen wurden durch Eiswasser gekühlt).

II.3.2.b Bestimmung des Glykogengehaltes in Leber und Skelettmuskulatur

Die Glykogenbestimmung erfolgte nach der Methode von Keppler u. Decker (1974). Diese Methode beruht auf dem Prinzip der enzymatischen Spaltung von Glykogen zu Glukose durch die Amyloglucosidase. Glukose wurde dann mit dem Test-Kit „Gluko-Quant[®] bestimmt.

II.3.2.c Bestimmung von ATP, Glukose-6-Phosphat (G6P), Fruktose-6-Phosphat (F6P) in Leber und Skelettmuskulatur

Bei der Bestimmung der obigen Parameter wurde das jeweils in der Endreaktion entstehende reduzierte Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat (NADPH) photometrisch gemessen. Die Analyse erfolgte in Anlehnung an die Methode nach Keppler u. Decker (1974).

II.3.2.d Bestimmung des Triglyzeridgehaltes in der Leber

Die Extraktion der TG aus der Leber erfolgte in einem Gemisch aus Methanol und Dichlormethan, nach Abdampfen des Dispersionsmittels wurde der Rückstand in 2-Propanol aufgenommen. Alle Chemikalien wurden von der Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen bezogen. Mit dem Testkit „TG GPO-PAP“ wurden die Triglyzeride quantifiziert.

II.4 Berechnungen und Statistik

II.4.1 Berechnungen

II.4.1.a Netto-Blutglukoseprofil

Zur Bestimmung des Netto-Blutglukoseprofils bei den intraindividuellen oGTT-Studien wurde zu jedem Zeitpunkt die Differenz zwischen den Mittelwerten der gemessenen Blutglukose und dem Mittelwert zum Zeitpunkt t=0 (vor Applikation der Glukose) berechnet.

II.4.1.b Fläche unter der Kurve (AUC)

Aus den o.g. Werten wurde die AUC mit dem Programm Xlfit4 Excel Add-In Version 4.1.1 berechnet.

II.4.1.c Kohlenhydrat- und Fettoxidation

Die Berechnung der Oxidation dieser Substrate erfolgte ausgehend von gemessenem Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxidproduktion (Frenz, 1994):

$$\text{KHO [g]} = -2,97 \cdot V(\text{O}_2) [\text{l}] + 4,17 \cdot V(\text{CO}_2) [\text{l}] - 2,44 \cdot \text{N [g]}$$

$$\text{FO [g]} = 1,72 \cdot V(\text{O}_2) [\text{l}] - 1,72 \cdot V(\text{CO}_2) [\text{l}] - 1,96 \cdot \text{N [g]}$$

Für die Stickstoffoxidation wurde ein Wert von 0,3 g angenommen, der sich als durchschnittlicher Wert bei der Analyse der Stickstofffraktion im Urin ergab (Daten nicht gezeigt).

II.4.1.d Gesamtleberglykogen

Zur Berechnung des Glykogengehaltes der Leber wurde die Glykogenmenge pro Gramm Lebergewebe pro Tier mit deren Lebermasse multipliziert.

II.4.1.e Gesamtgehalt an freier Glukose

Zur Berechnung des Gehaltes an freier Glukose der Leber wurde die freie Glukose pro Gramm Lebergewebe pro Tier mit deren Lebermasse multipliziert.

II.4.1.f Skelettmuskelmasse

Die Skelettmuskelmasse wurde anhand der Körpermasse geschätzt (Even et al., 2001).

II.4.1.g Glykogengehalt der Skelettmuskulatur

Zur Schätzung des Glykogengehaltes der Skelettmuskulatur wurde die Glykogenmenge pro Gramm Muskelgewebe pro Tier mit der ermittelten Skelettmuskelmasse multipliziert.

II.4.1.h Bilanzierung von Stoffwechselfparametern

Zur Bilanzierung von Stoffwechselfparametern wurde stets der Nettofluss berechnet, d.h. von den zum jeweiligen Zeitpunkt gemessenen Werten wurde der Durchschnitt des Mittelwerts zum Zeitpunkt $t=0$ (vor Applikation der Glukose) subtrahiert.

II.4.2 Statistik

Die Durchführung der deskriptiven Statistik und der Regressionsanalysen, im Rahmen der Linearitätsbestimmung für die PDH-Aktivitäts-Messungen (Abb. II-5,6), erfolgten mit dem Programm Microsoft® Excel 2000, Microsoft, Redmond, USA.

Da die metabolisch relevanten Veränderungen in den Kapiteln III.1 bis III.2.4.1 bzw. III.3.1 bis III.3.4.1 zweifelsfrei erkennbar sind, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit auf Signifikanzmarkierungen verzichtet.

Die Vergleiche der Gruppen in den biochemischen (Kapitel III.2.4.3, III.3.4.3) und pharmakologischen Studien (Kapitel III.4) wurden mit einer ein- und zweifaktoriellen Bonferroni-korrigierten Varianzanalyse durchgeführt. Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Software-Programms „Sigma Stat 2.03“ (Jandel Scientific GmbH, Erkrath, Deutschland). Als minimales Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ angenommen.

III. Ergebnisse

III.1 oGTT bei Wistar Ratten

Zur Untersuchung der Dosis- und Zeitabhängigkeit einer oralen Glukosebelastung wurde zunächst ein oGTT mit unterschiedlich hohen Glukosedosen ($\frac{1}{2}$, 1 und 2 g Glukose pro kg KM) durchgeführt. Ziel dieses Versuches war es, eine geeignete Dosis für den in dieser Arbeit verwendeten oGTT zu finden. Zum Studium der Konzentrationsabhängigkeit wurde ein Tiermodell mit einer normalen (ungestörten) Physiologie des Intermediärstoffwechsels gewählt. Die Versuchstiere, 16 Wochen alte, männliche Wistar Ratten [HsdCpb:WU], wurden in 4 Gruppen (n=8) aufgeteilt und nach der Körpermasse per os appliziert (Tabelle III-1).

Zum Studium der genannten Fragestellung wurde mit diesem Kollektiv sowohl ein Blutglukoseprofil (III.1.1) erstellt als auch der RQ und die KHO (III.1.2) über die Atemgasanalyse bestimmt.

Tabelle III-1 Körpermasse der 16 Wochen alten Wistar Ratten und applizierte Glukosemenge im jeweiligen oGTT. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8.

oGTT	Körpermasse [g]	Applizierte Glukose [mg]
Kontrolle	316 \pm 3	
0,5 g/kg KM p.o	311 \pm 9	155 \pm 5
1 g/kg KM p.o	316 \pm 10	316 \pm 10
2 g/kg KM p.o	313 \pm 8	627 \pm 16

III.1.1 oGTT intraindividuell - Blutglukoseprofil

Die Darstellung des Blutglukoseprofils zeigt Abb. III-1. Die Nüchtern-Blutglukose lag in allen Gruppen bei $\pm 3,9$ mmol/l, dieser Wert blieb auch während des Versuchs für die Kontrollgruppe konstant bestehen. Bei der Glukosebelastung von 0,5 g/kg KM (Abb. III-1, A) stieg die Blutglukose binnen 30 Minuten nach Applikation auf 6,8 mmol/l an und begann bereits eine halbe Stunde später wieder auf Ausgangsniveau ($\pm 4,2$ mmol/l) zu fallen.

Bei einer Glukosebelastung von 1 g/kg KM (Abb. III-1, B) erreichte der Blutglukosespiegel ebenfalls nach 30 Minuten sein Maximum (8,1 mmol/l) im Vergleich zum oGTT mit der halben Glukosedosis, sank jedoch langsamer und lag erst zum Zeitpunkt $t=2$ h bei einem Wert von 4,7 mmol/l. Bis zum Versuchsende änderte sich die Blutglukose dann kaum noch (4,4 mmol/l).

Bei dem oGTT mit der höchsten Glukosebelastung zeigte sich im Blutglukoseprofil (Abb. III-1, C) bei dem Zeitfenster von 0,5 h (7,3 mmol/l), 1 h (7,8 mmol/l) und 1,5 h (7,3 mmol/l) wenig Dynamik. Nach diesem plateauartigen Verlauf nahm der Blutglukosewert auf 5,2 mmol/l ab und änderte sich auch hier bis zum letzten Messwert (4,7 mmol/l) kaum noch.

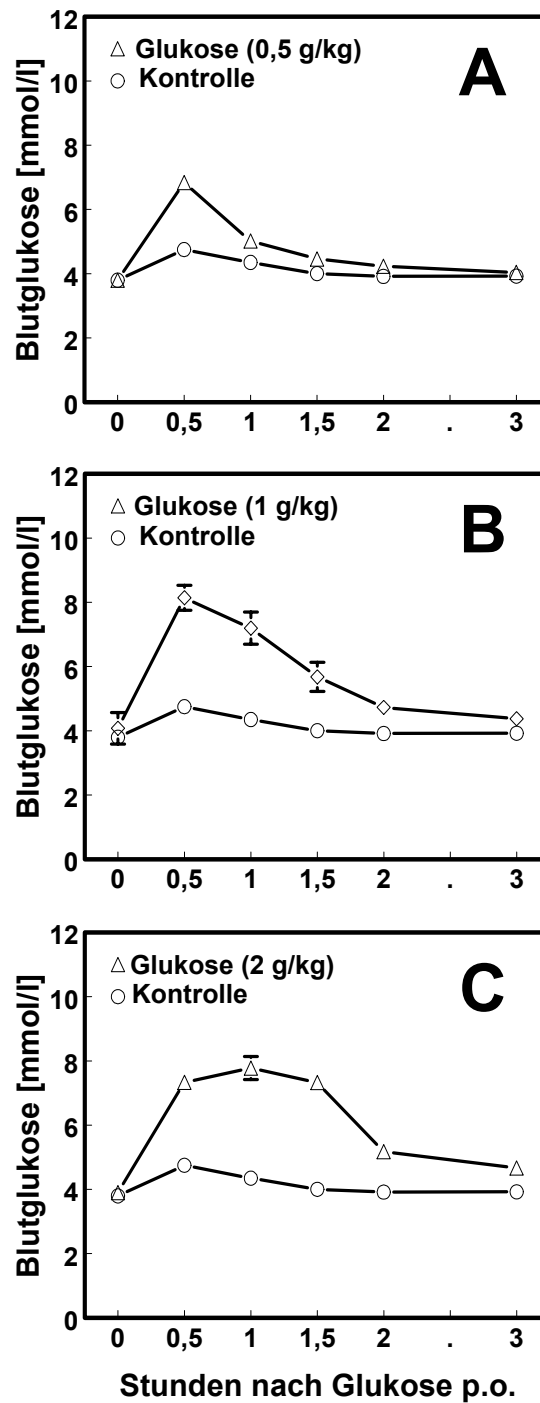


Abb. III-1. Verlauf der Blutglukose nach einer oralen Glukosebelastung von 0,5 (**A**), 1 (**B**) und 2 g/kg (**C**) bei 16 Wochen alten Wistar Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Um das Ausmaß des Blutglukoseanstieges anschaulicher darzustellen bzw. quantifizieren zu können, wurde die AUC (Abb. III-2, B) ausgehend von dem berechneten Nettoglukosefluss (Abb. III-2, A) bestimmt (Kap. II.4.1.a/b).

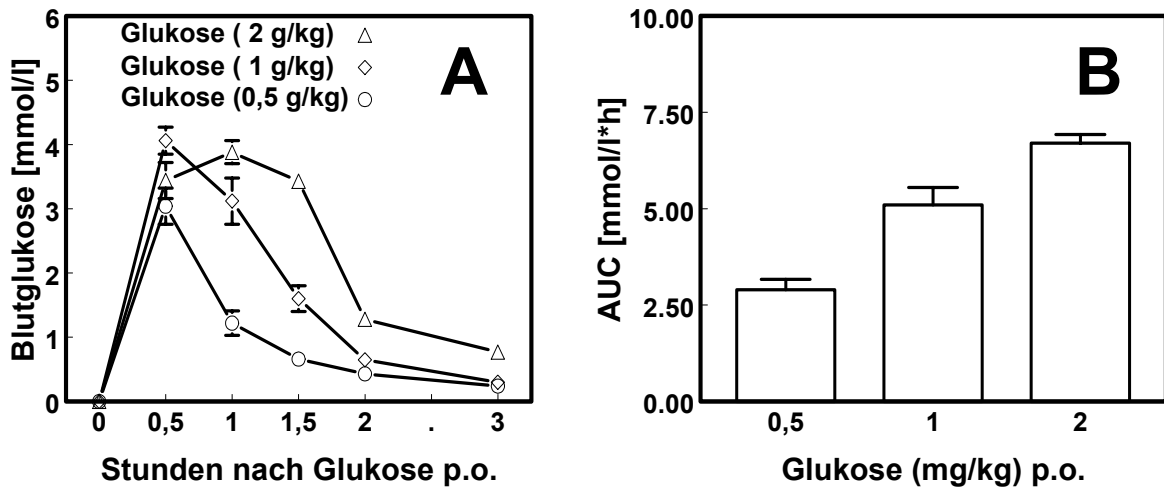


Abb. III-2 Verlauf des berechneten Netto-Blutglukoseanstieges (**A**) und der dazugehörigen AUC (**B**) nach einer oralen Glukosebelastung von 0,5, 1 und 2 g/kg KM bei 16 Wochen alten Wistar Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8 (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Die Dosisabhängigkeit des oGTT spiegelte sich signifikant in der AUC wider. Bei der Glukosebelastung in der mittleren Dosierung lag die AUC um einen Faktor 1,7 höher im Vergleich zum oGTT mit 0,5 g/kg KM bzw. um 25% niedriger als bei dem Versuch mit 2 g Glukose pro kg KM. Das Verhältnis zwischen höchster und niedrigster Dosierung war 2,3.

III.1.2 oGTT intraindividuell - Indirekte Kalorimetrie

Der RQ (Abb. III-3, A-B-C) lag bei allen Testgruppen zu Beginn des Versuches bei $\pm 0,75$ und änderte sich im Verlaufe des oGTT innerhalb der Kontrolle nicht. Die basale KHO der Kontrolltiere (Abb. III-3, D-E-F) lag während des Versuchszeitraumes bei ± 28 mg/h/Tier.

Bei dem oGTT mit 0,5 g/kg KM stieg der RQ (Abb. III-3, A) zum Zeitpunkt des Blutglukosemaximums kurzfristig auf 0,76 und blieb danach bis zum Versuchsende konstant bei 0,75. In diesem Zeitfenster erhöhte sich die KHO (Abb. III-3, D) auf 44 mg/h/Tier und unterschied sich bereits eine Stunde später nicht mehr von der Kontrolle.

Auch bei dem oGTT mit 1 g Glukose pro kg KM äußerte sich der Anstieg der Blutglukose nur in einer mäßigen Änderung des RQ (Abb. III-3, B): 0,77 bei $t=1$ h. Zu diesem Zeitpunkt lag die KHO (Abb. III-3, E) bei 66 mg/h/Tier und fiel zeitgleich mit dem RQ wieder eine Stunde später auf das basale Niveau der Kontrolltiere zurück.

Bei dem oGTT mit der höchsten Dosierung verursachte die Glukosegabe einen signifikanten Anstieg des RQ (Abb. III-3, C) auf 0,83 ($t=1$ h). Analog dazu erhöhte sich die KHO auf 185 mg/h/Tier. Zwei Stunden später fiel der RQ auf den Anfangswert (0,76) zurück, während die KHO (Abb. III-3, F) 66 mg/h/Tier betrug und bis zum letzten Messwert (64 mg/h/Tier) auf diesem Niveau verweilte.

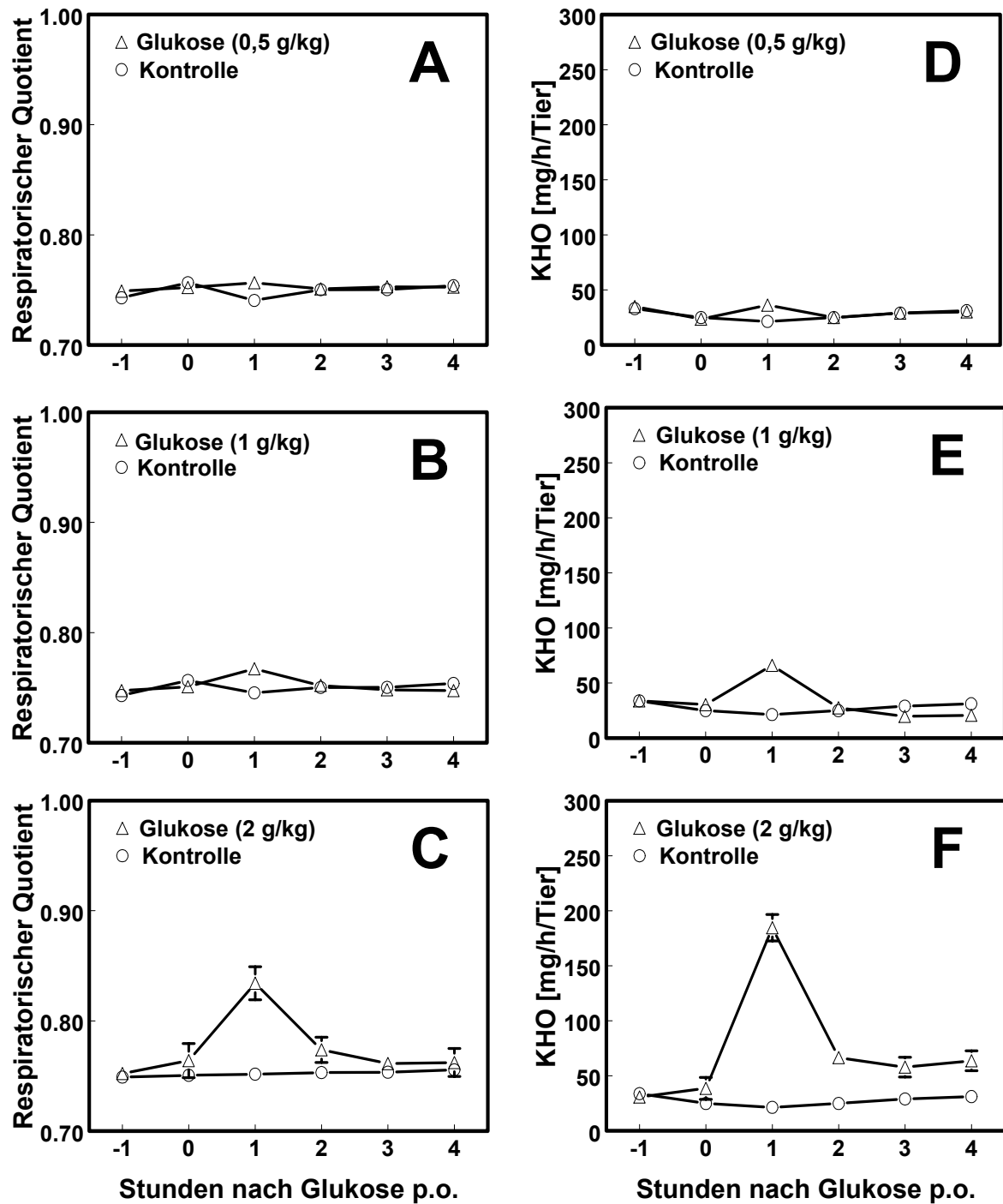


Abb. III-3 Verlauf des RQ und der Glukoseoxidation nach einer oralen Glukosebelastung mit 0,5 (A, D), 1 (B, E) und 2 g/kg (C, F) bei den 16 Wochen alten Wistar Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=7-8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Ergebnisse

Analog zu dem Blutglukoseprofil wurde die Netto-KHO für das jeweilige Messfenster (Abb. III-4, A), sowie über den gesamten Versuchszeitraum (Abb. III-4, B) berechnet.

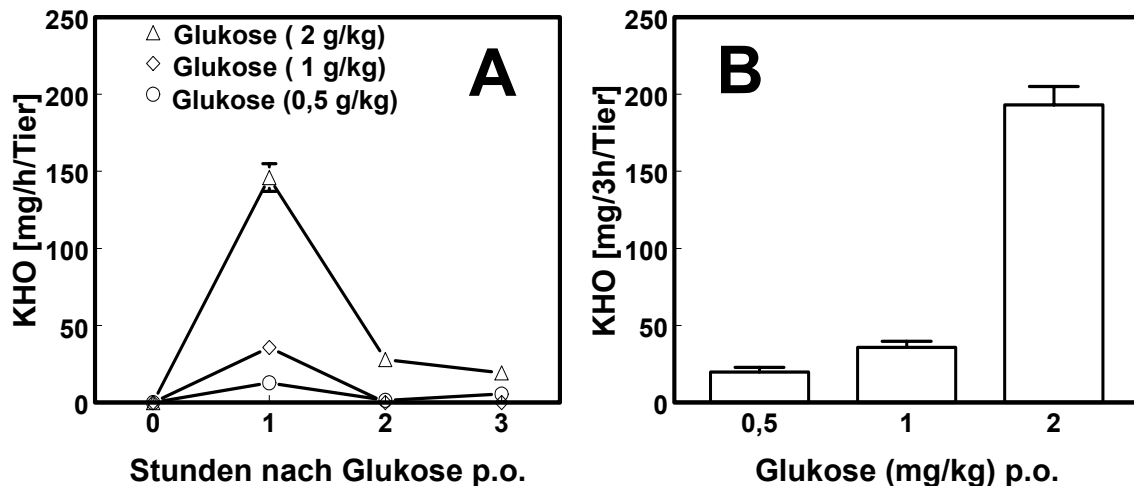


Abb. III-4 Verlauf der berechneten Netto-KHO (A), sowie die Netto-KHO über den Zeitraum von 3 Stunden (B) nach der oralen Glukosebelastung von 0,5, 1 und 2 g/kg KM bei 16 Wochen alten Wistar Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=7-8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Die Netto-KHO (Abb. III-4, B) bei dem oGTT in der höchsten Dosierung unterschied sich mit 193 mg/3h/Tier signifikant von den beiden anderen: 20 mg/3h/Tier (niedrigste Dosis) und 36 mg/3h/Tier (mittlere Dosis).

Aufgrund dieser Vorversuche wurde für alle folgenden oGTT eine Glukosedosis von 2 g/kg KM gewählt, da diese zu einem kontinuierlichen Anstieg und Abfall der Blutglukose führte (Abb. III-1, C) und in einer signifikanten Zunahme der KHO (Abb. III-4, A) resultierte. Bei den beiden niedrigen Konzentrationen war der Verlauf der Blutglukose sehr sprunghaft (Abb. III-1, A/B), und die KHO (Abb. III-4, A) verlief nur geringgradig über der basalen Oxidationsrate.

III.1.3 oGTT - interindividuell

Mit Hilfe dieses interindividuellen oGTT soll die Bedeutung des nicht-oxidativen Glukosestoffwechsels nach einem oGTT untersucht werden. Anhand von klinisch-chemischen Blutparametern (III.1.3.1.a) wurden die schnellen Stoffwechselregulationen nach Glukosegabe aufgezeigt und anhand der Bestimmung von Leber- und Muskelglykogen (III.1.3.1.b) der Fluss der applizierten Glukose in diese beiden Kompartimente bilanziert (III.1.4).

Als Versuchstiere wurden 8 Wochen alte, männliche Wistar Ratten [HsdCpb:WU] verwendet (Tabelle III-2). Zum Zeitpunkt $t=0$ (Kontrolle), 60, 120 und 180 min nach Glukosegabe (2 g/kg KM p.o.) erfolgte bei je einer Satellitengruppe ($n=8$) eine Blut- und Organentnahme.

Tabelle III-2 Körpermasse und applizierte Glukosemenge der jeweiligen Satellitengruppe. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$.

Zeitfenster [min]	Körpermasse [g]	Applizierte Glukose [mg]
0	260 \pm 3	
60	264 \pm 5	528 \pm 9
120	256 \pm 5	513 \pm 11
180	263 \pm 4	525 \pm 7

III.1.3.1 Metabolische Parameter

III.1.3.1.a Blut/Serum

Innerhalb von 60 Minuten nach Glukosegabe stieg die Blutglukose (Abb. III-5, A) rasch von 3,8 mmol/l auf einen Wert von 7,5 mmol/l an. Parallel mit dem Anstieg der Blutglukose zeigte sich in diesem Zeitfenster auch bei der Insulinausschüttung (Abb. III-5, B) ein peakartiger Verlauf, ausgehend von 0,7 ng/ml auf 1,3 ng/ml. Nach Erreichen der Maximalwerte fielen Blutglukose und Insulin zum Versuchsende wieder auf die Ausgangswerte zurück, wobei die Blutglukose mit 4,4 mmol/l etwas über dem Wert zum Zeitpunkt $t=0$ min lag.

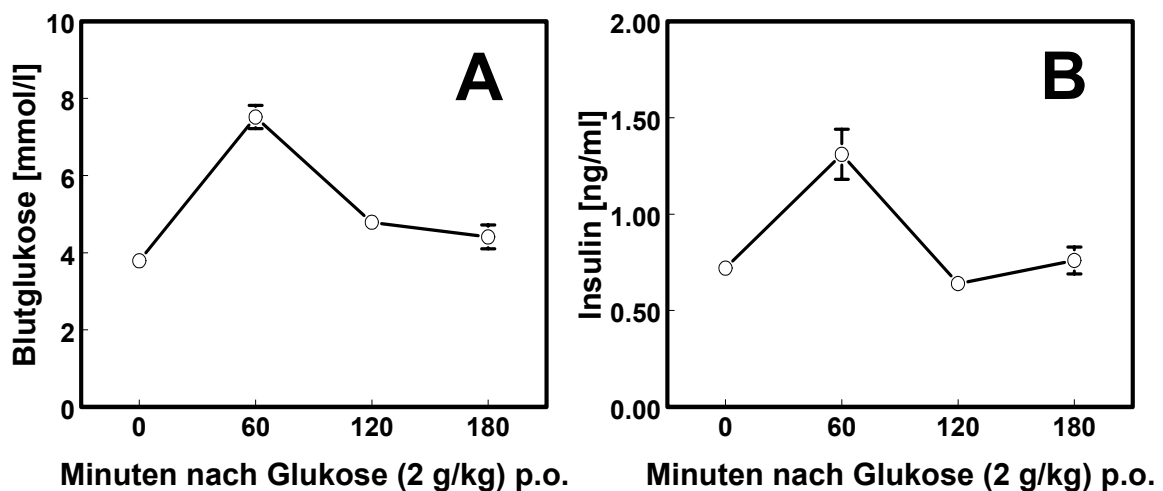


Abb. III-5 Verlauf von Blutglukose (A) und Insulin (B) während des oGTT bei den 8 Wochen alten Wistar Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Der Laktatverlauf (Abb. III-6) war ähnlich dem von Glukose und Insulin, der Endwert lag jedoch mit 1,4 mmol/l unter dem Nüchtern-Wert von 2 mmol/l.

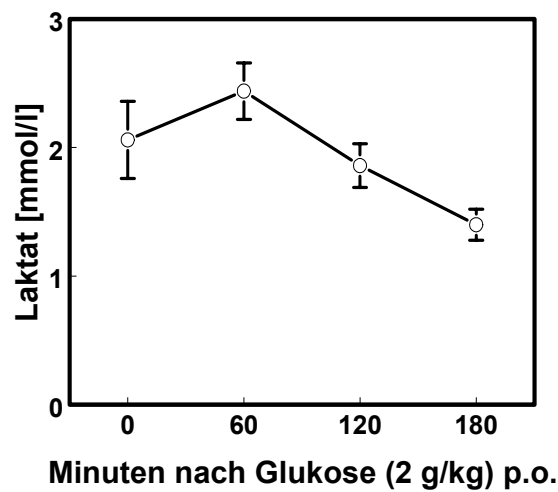


Abb. III-6 Verlauf von Laktat während des oGTT bei den 8 Wochen alten Wistar Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8.

Annähernd umgekehrt verliefen die Parameter des Lipidstoffwechsels (Abb III-7, 8). Die FFS (Abb. III-7, A) fielen von 0,53 mmol/l auf einen Wert von 0,17 mmol/l ab und erreichten zwei Stunden nach Glukosebelastung wieder ihr Ausgangsniveau. Analog verhielten sich die TG (Abb. III-7, B): die Werte sanken von 0,43 mmol/l auf 0,15 mmol/l und blieben mit dem 2-Stunden Wert von 0,38 mmol/l jedoch leicht unter dem Ausgangswert.

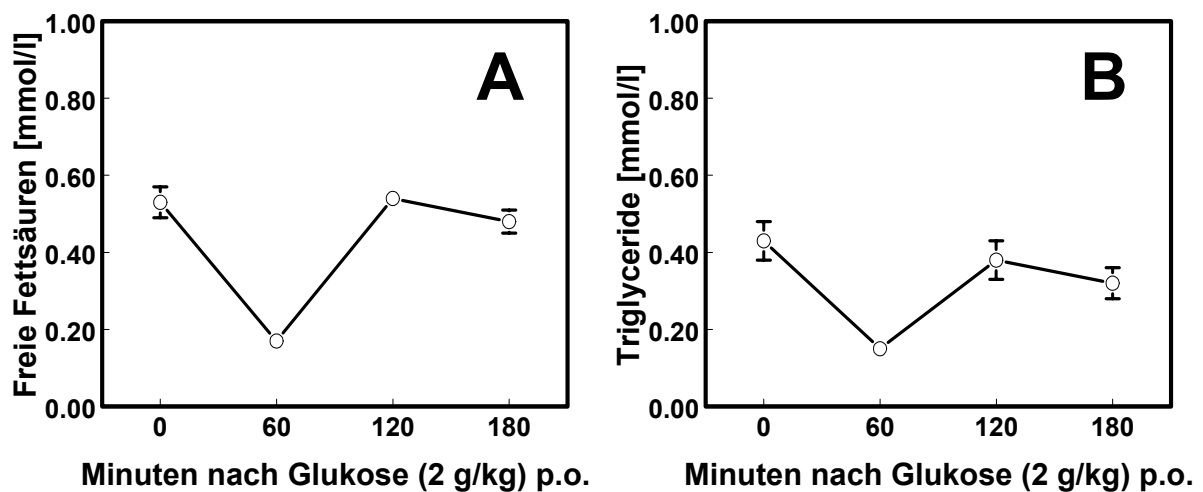


Abb. III-7 Verlauf von freien Fettsäuren (A) und Triglyceriden (B) während des oGTT bei den 8 Wochen alten Wistar Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8 (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Die Ketonkörper (Abb. III-8) fielen, zum Zeitpunkt des Glukosepeaks, von 1583 $\mu\text{mol/l}$ auf 133 $\mu\text{mol/l}$ stark ab und lagen mit 1445 $\mu\text{mol/l}$ zum Versuchsende wieder im Bereich der Anfangswerte.

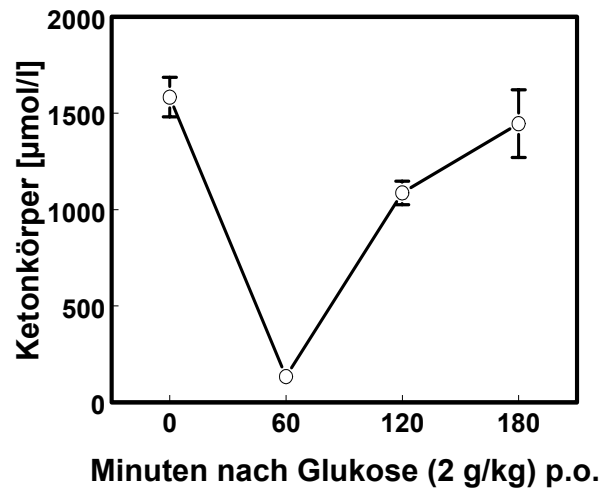


Abb. III-8 Verlauf der Ketonkörper nach Glukosebelastung bei den 8 Wochen alten Wistar Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Cholesterin (Abb. III-9) sank nach der Glukosegabe von 2,2 mmol/l auf 1,5 mmol/l ($t=120$ min), und lag gegen Ende bei 1,7 mmol/l.

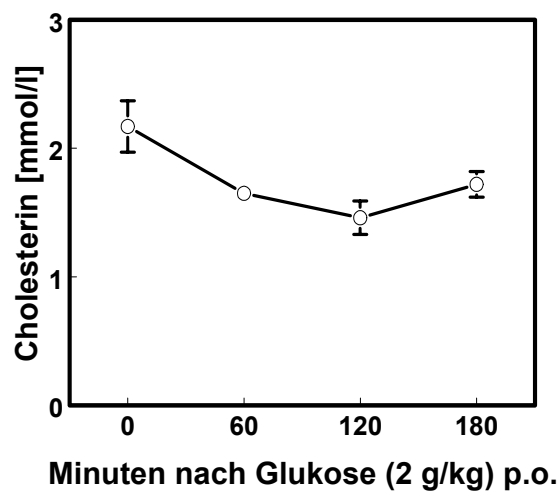


Abb. III-9 Verlauf von Cholesterin nach Glukosebelastung bei den 8 Wochen alten Wistar Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

III.1.3.1.b Organparameter

Das Leberglykogen (Abb. III-10) stieg nach der Glukose-Belastung von 0,2 mg/g auf 3,1 mg/g ($t=120$ min) und sank zum Ende des Versuches wieder um 1,3 mg/g. Der Strom an freier Glukose (Abb. III-10) lag betragsmäßig über dem Glykogenfluss und verlief analog. Die freie Glukose erhöhte sich von 1,5 mg/g zu Versuchsbeginn auf 5,3 mg/g ($t=120$ min) und nahm bis zur 3. Stunde um 0,5 mg/g ab. Das Muskelglykogen (Abb. III-10) stieg nur in den ersten 60 Minuten nach Glukosegabe von 0,9 mg/g auf 1,2 mg/g und blieb bis zur 3. Stunde auf diesem Niveau.

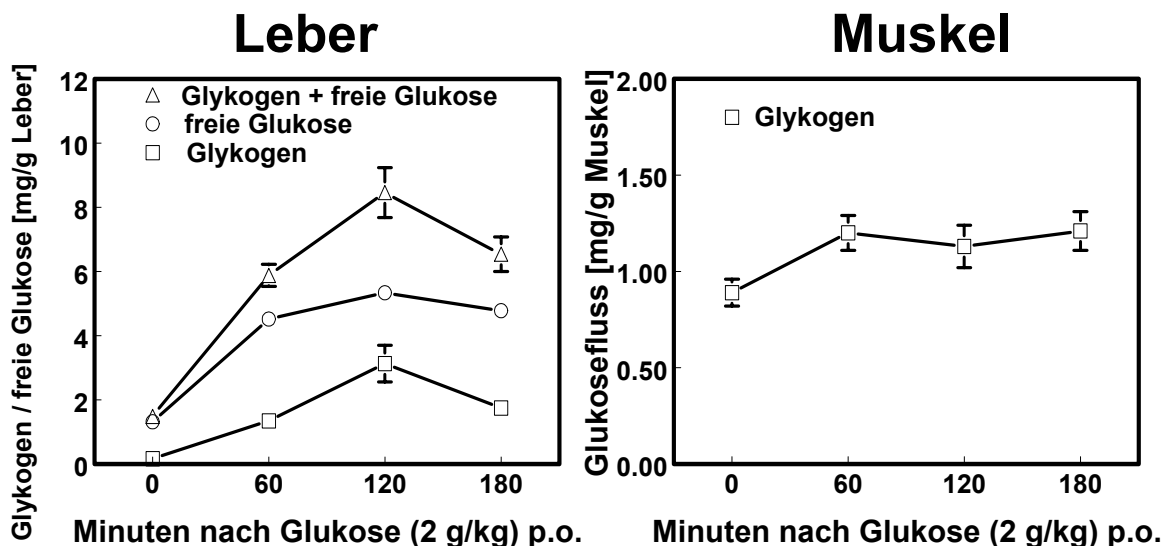


Abb. III-10 Fluss von Glukose in Leber und Muskel pro Gramm Feuchtgewicht während des oGTT bei den 8 Wochen alten Wistar Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Ergebnisse

Ausgehend von der Lebermasse und der geschätzten Skelettmuskelmasse (Tabelle III-3) wurde der Gesamtfluss an Glukoseäquivalenten in diese beiden Kompartimente berechnet (II.4.1.d/e).

Tabelle III-3 Lebermasse und geschätzte Skelettmuskelmasse der jeweiligen Satellitengruppe. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8.

Zeitfenster [min]	Lebermasse [g]	Skelettmuskelmasse [g]
0	7,2 \pm 0,3	117 \pm 2
60	7,8 \pm 0,2	119 \pm 2
120	7,4 \pm 0,3	115 \pm 2
180	7,7 \pm 0,2	118 \pm 2

Die Skelettmuskelmasse wurde auf 45% der Körpermasse der Versuchstiere geschätzt (Even et al., 2001).

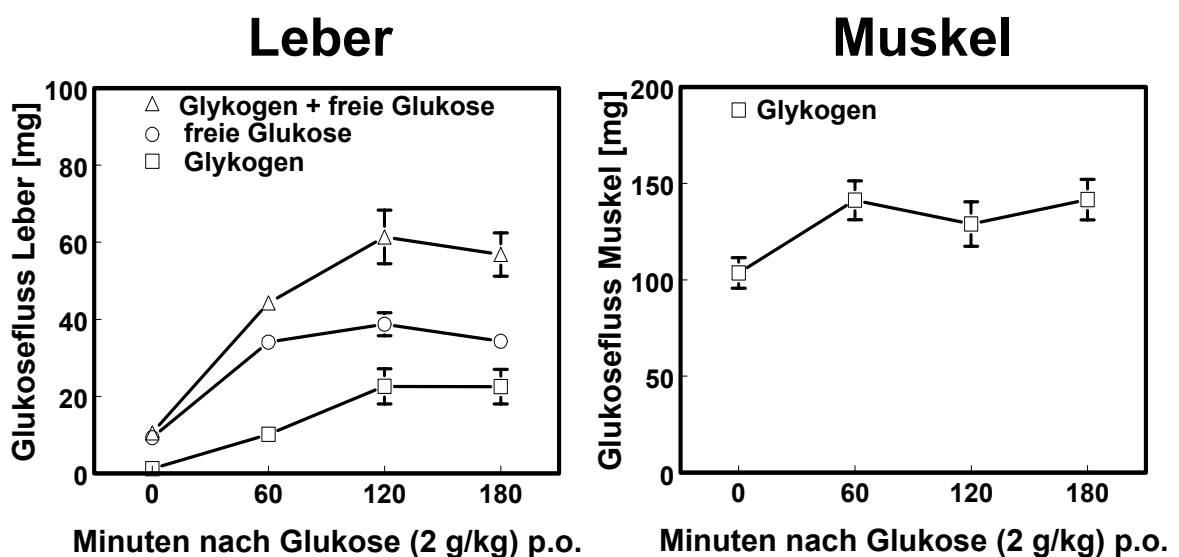


Abb. III-11 Gesamtfluss von Glukose in Leber und Skelettmuskulatur während des oGTT bei den 8 Wochen alten Wistar Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8 (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Das Leberglykogen (Abb. III-11) erhöhte sich von 1,2 mg (t=0) auf 22,5 mg bis zur letzten Messung. Zu Ende des oGTT betrug der Gehalt an freier Glukose in der Leber (Abb. III-11) 34,3 mg im Vergleich zum Anfangswert (9,3 mg/Leber). Der

Glykogengehalt der Muskulatur (Abb. III-11) lag zum Zeitpunkt $t=0$ min bei 104 mg und stieg bis zum Versuchsende auf 142 mg an.

Für die weitere Bilanzierung (III.1.4) wurde der Netto-Glukosefluss bis zum Versuchsende (Tabelle III-4) in die o.g. Kompartimente berechnet.

Tabelle III-4 Netto-Glukosefluss in Leber und Muskel bis zum Ende des oGTT bei den 8 Wochen alten Wistar Ratten.

Kompartiment	Netto-Glukosefluss
Freie Glukose, Leber	25 mg
Glykogen, Leber	21 mg
Glykogen, Muskel	38 mg

Die Leber-TG (Abb. III-12) stiegen 60 Minuten nach Applikation von 5,6 mg/g Leber auf 6,8 mg/g Leber und nahmen bis zur 3. Stunde um 2,7 mg/g Leber ab.

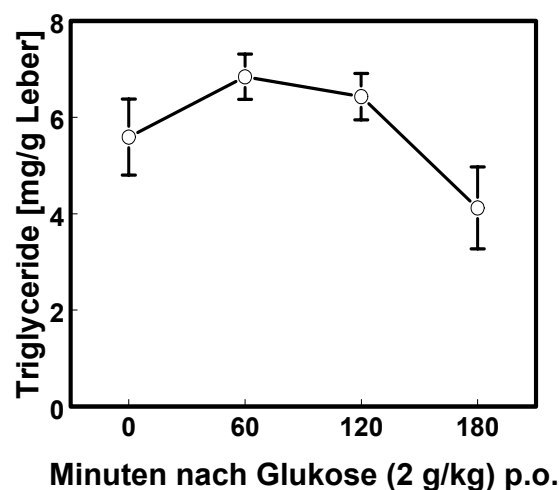


Abb. III-12 Verlauf der Lebertriglyceride während des oGTT bei den 8 Wochen alten Wistar Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$.

III.1.4 Bilanzierung

Bei der Bilanzierung wurde berechnet, wie viel der applizierten Glukosemenge letztendlich oxidiert wurde bzw. über den nicht-oxidativen Stoffwechselweg in Leber und Muskel gespeichert wurde. Unter der Prämisse einer lediglich gewichtsabhängigen (altersunabhängigen) Glukose-Applikation und einer unveränderten Insulinsensitivität bei den 8 und 16 Wochen alten Wistar Ratten, wurde der intra- und interindividuelle oGTT (2 g/kg KM) in der Bilanzierung zusammengefasst. Die Netto-KHO (Abb III-4, B), sowie der Netto-Glukosefluss in die Kompartimente Leber und Muskel (Tabelle III-4) wurden ins Verhältnis zu der applizierten Glukosemenge (Tabelle III-1, 2) gesetzt. Die Anteile wurden in der Tortengraphik (Abb. III-13) als Prozentwerte angegeben.

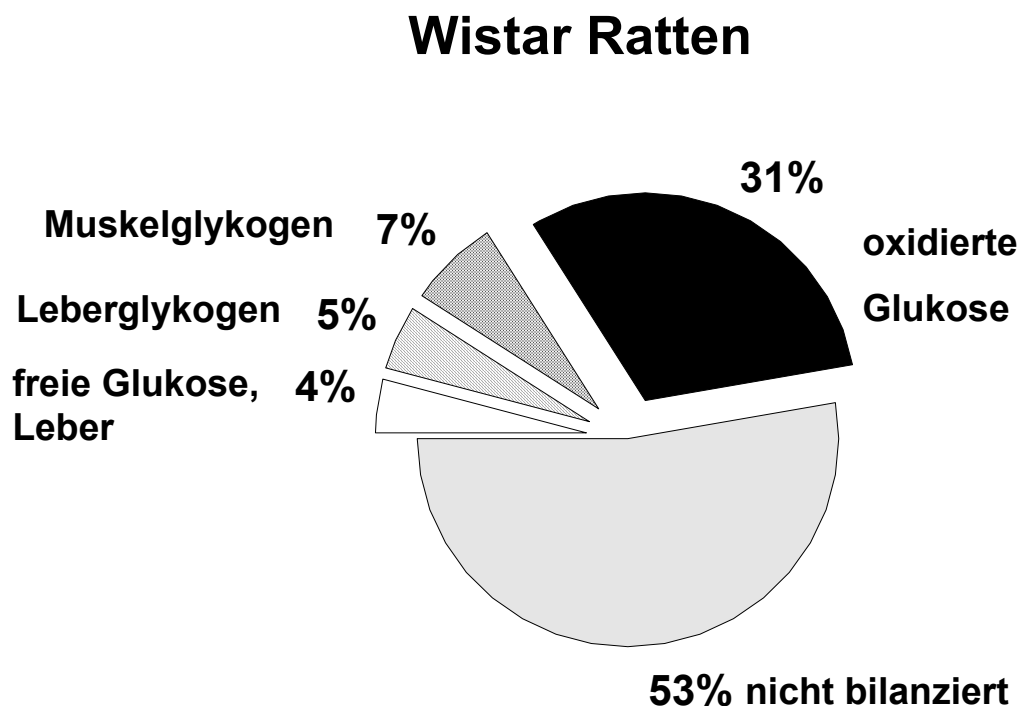


Abb. III-13 Prozentuale Anteile von oxidiertem Glukose, Muskelglykogen, Leberglykogen und freier Glukose (Leber) an der applizierten Glukosemenge bei den Wistar Ratten.

Von der applizierten Glukose wurden 31% oxidativ und 16% nicht-oxidativ verstoffwechselt. Der Anteil der gespeicherten Glukose betrug in der Leber 9%, bestehend aus 4% freier Glukose bzw. 5% Leberglykogen und in der Muskulatur 7%. 53% der applizierten Glukose konnten nicht bilanziert werden.

Die Tabelle III-5 zeigt die Bilanzierung zusätzlich in tabellarischer Form.

Tabelle III-5 Prozentuale Anteile oxidierter Glukose, Muskelglykogen, Leberglykogen, freier Glukose (Leber) an der applizierten Glukosemenge bei den Wistar Ratten (oGTT: intra-individuell, interindividuell)

	Glukose pro Kompartiment			
	KGW (g)	appl. Glukose (mg)	absolut (mg)	relativ (%)
intra-individuell KHO	313	627	193	31
inter-individuell	256-264	513-528		
Muskelglykogen			36-37	7
Leberglykogen			26	5
Leber: freie Glukose			21	4
nicht-bilanziert			272-280	53

Die Glukosetoleranz wurde nun altersabhängig am Tiermodell der ZDF-Ratten untersucht. Für die Experimente wurden 8 und 16 Wochen alte, männliche ZDF-Ratten, schlank [ZDF/Gmi-Fa/?] vs. obese [ZDF/Gmi-fa/fa], verwendet. Die Tiere jeder Altersgruppe wurden in je zwei Versuchsgruppen aufgeteilt; mit dem einem Kollektiv wurden die intraindividuellen Studien (Blutglukoseprofil, indirekte Kalorimetrie, renaler Glukoseverlust) und mit dem anderen ein interindividueller oGTT durchgeführt. Aufgrund der Vorversuche (Kapitel III.1.1, III.1.2) wurde für alle oGTT stets eine Glukose-Dosis von 2 g/kg KM verwendet.

III.2 oGTT bei 8 Wochen alten ZDF-Ratten

Die Körpermasse und applizierte Glukosemenge der für die intraindividuellen Studien verwendeten Tierkollektive sind in Tabelle III-5 aufgeführt.

Tabelle III-6 Körpermasse und applizierte Glukosemenge der in den intraindividuellen oGTT-Studien verwendeten 8 Wochen alten, schlanken und obesen ZDF-Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8.

Gruppe	Körpermasse [g]		Applizierte Glukose [mg]	
	schlank	obese	schlank	obese
Kontrolle	203 \pm 5	221 \pm 2		
Glukose-belastung	203 \pm 8	236 \pm 2	405 \pm 11	471 \pm 4

III.2.1 oGTT intraindividuell - Blutglukoseprofil

Bei der Untersuchung der Glukosetoleranz wurde zunächst der Verlauf der Blutglukose nach Glukosegabe untersucht.

Die Blutglukoseprofile der schlanken (Abb. III-14, A) und obesen (Abb. III-14, B) Tiere zeigten einen ähnlichen Verlauf. Der Anfangswert der Blutglukose in der obesen Gruppe lag mit 6,4 mmol/l über dem der schlanken Tiere (4,1 mmol/l).

In beiden Fällen erreichte der Blutglukosespiegel nach 30 Minuten seinen Maximalwert (schlank: 7,0 mmol/l, obese: 11,6 mmol/l) und sank bis zum Ende des Versuchs wieder jeweils leicht unter die Ausgangswerte (schlank: 3,6 mmol/l, obese: 4,7 mmol/l). Verglichen mit der schlanken Gruppe lag im obesen Kollektiv der Ausgangspunkt des oGTT höher, der Anstieg der Blutglukose war steiler, und der Peak bewegte sich bei signifikant höheren Werten.

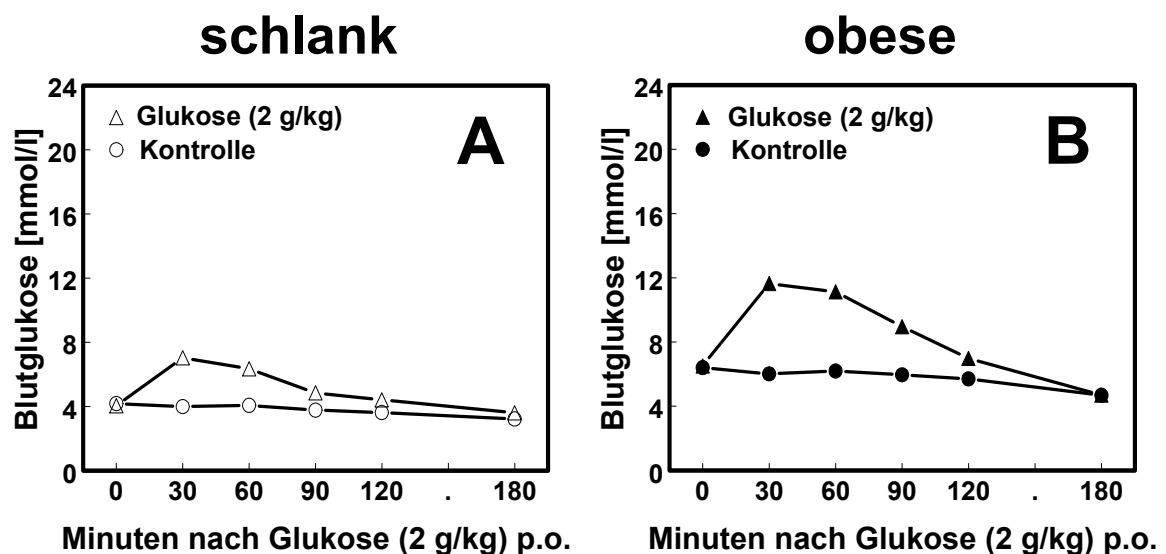


Abb. III-14 Blutglukoseprofil während des oGTT bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank (A) vs. obese (B). Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Um den Anstieg der Blutglukose betragsmäßig darzustellen, wurde für die Gruppen mit Glukosebelastung der Netto-Blutglukoseanstieg (Abb. III-15, A) und die Fläche unter der Kurve (Abb. III-15, B) berechnet.

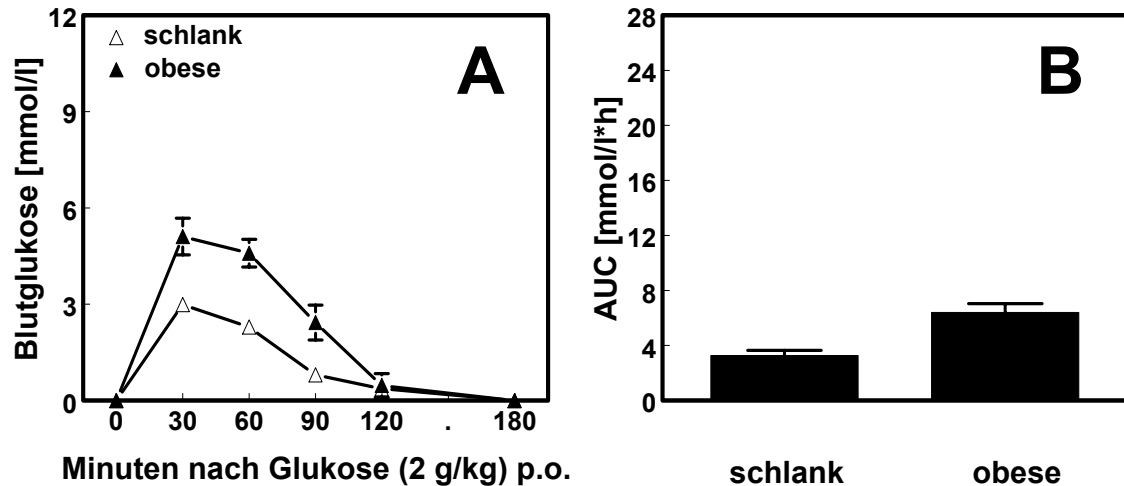


Abb. III-15 Verlauf des berechneten Netto-Blutglukoseanstieges (A) und der dazugehörigen AUC (B) nach der oralen Glukosebelastung bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Die obesen Ratten hatten im Vergleich zu den schlanken Tieren eine um den Faktor 2 höhere AUC, welches ein Ausdruck der bereits gestörten Glukosetoleranz ist.

III.2.2 oGTT intraindividuell - Indirekte Kalorimetrie

Die folgenden Daten erläutern die Untersuchung des oxidativen Stoffwechsels während des oGTT mittels indirekter Kalorimetrie.

Der RQ der schlanken (Abb. III-16, A) und obesen (Abb. III-16, B) Tiere lag zu Beginn des oGTT bei 0,74 und blieb bei den Kontrollen während des Versuchs konstant. Nach Glukosegabe stieg der RQ bei der schlanken Gruppe binnen 60 Minuten auf 0,8 und erreichte zwei Stunden später wieder den Ausgangswert. Auch in der obesen Gruppe erhöhte sich der RQ unmittelbar nach Applikation (0,81 bei $t=1h$), änderte sich bis zum Zeitfenster $t=2h$ nicht und sank bis zum Versuchsende auf 0,75.

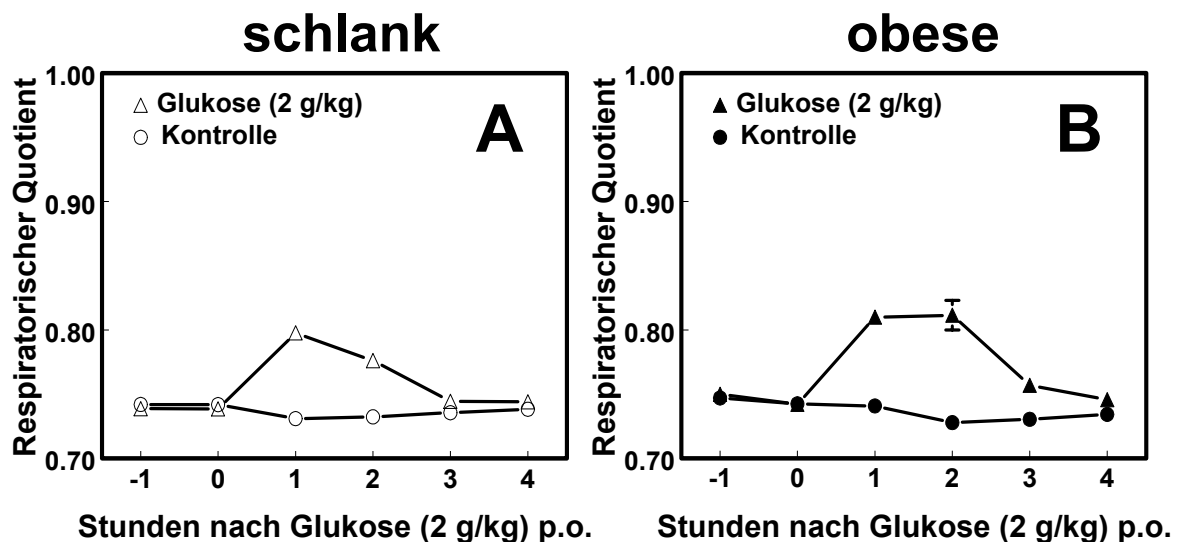


Abb. III-16 RQ-Profil während des oGTT bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank (A) vs. obese (B). Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=7-8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Der Verlauf des RQ und der KHO (Abb. III-17) zeigten ein paralleles Muster auf. Die KHO blieb bei den Kontrollen auf basalem Niveau (± 5 mg/h/Tier). In der schlanken Gruppe (Abb. III-17, A) stieg eine Stunde nach Gabe der Glukoselösung die Menge an oxidierten Kohlenhydraten rapide mit einem Peak von 95 mg/h/Tier an und fiel zwei Stunden später wieder auf Basalebene ab. Die KHO in der obesen Gruppe (Abb. III-17, B) erreichte eine Stunde nach Applikation einen höheren Maximalwert von 114 mg/h/Tier und sank bis bis zum Ende des oGTT langsamer ab.

Bei dem Messfenster $t=2$ h betrug die KHO noch 94 mg/h/Tier und fiel erst eine Stunde später signifikant ab (18 mg/h/Tier).

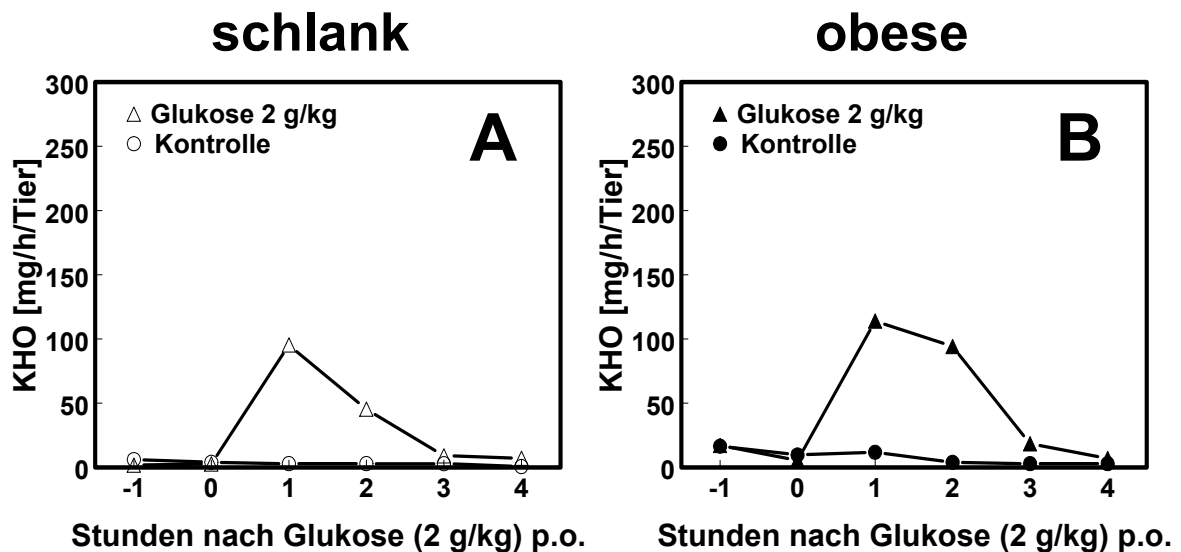


Abb. III-17 Menge an oxidiertem Glukose während des oGTT bei 8 den Wochen alten ZDF-Ratten, schlank (A) vs. obese (B). Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=7-8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Für die spätere Bilanzierung (III.2.4.2) wurde die Netto-KHO für das jeweilige Messfenster (Abb. III-18, A) sowie über den gesamten Versuchszeitraum (Abb. III-18, B) berechnet. Die KHO (Abb. III-18, B) der obesen Tiere lag mit 210 mg/3h/Tier um den Faktor 1,5 höher als die der schlanken ZDF-Ratten (142 mg/3h/Tier).

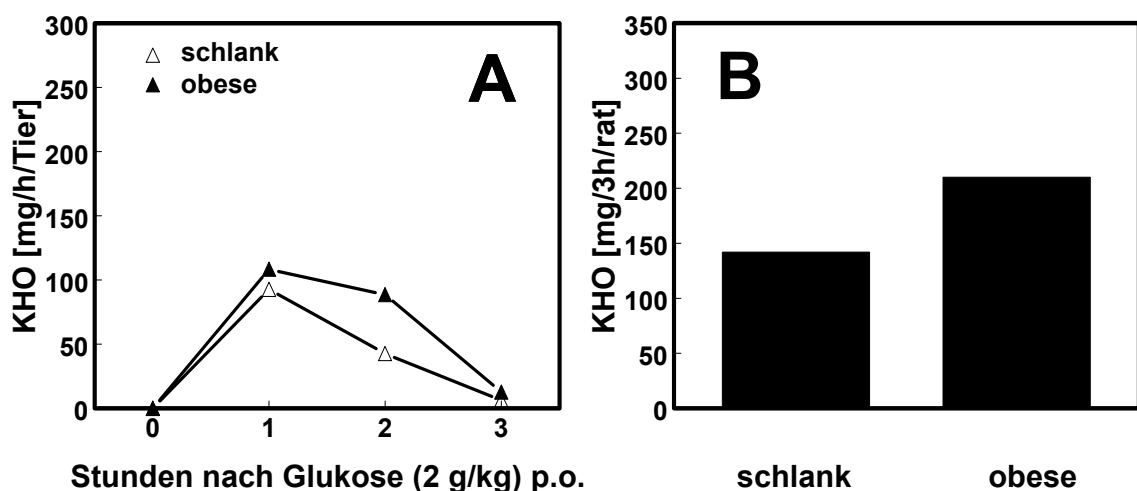


Abb. III-18 Verlauf der berechneten Netto-KHO (A), sowie die Netto-KHO über den Zeitraum von 3 Stunden (B) nach der oralen Glukosebelastung bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=7-8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

III.2.3 oGTT intraindividuell - Renaler Glukoseverlust

Während der Studie wurde die über die Nieren ausgeschiedene Glukosemenge bestimmt.

Die Ergebnisse des über sechs Stunden gesammelten Harns nach Glukosegabe sind in Tabelle III-6 zusammengestellt.

Tabelle III-7 Harnvolumen und Harnglukose, gemessen 6 Stunden nach Beginn des oGTT bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8.

Gruppe	Harnvolumen [ml]		Harnglukose [mg]	
	Kontrolle	Glukose-belastung	Kontrolle	Glukose-belastung
Schlank	2,1 \pm 0,3	1,6 \pm 0,2	0,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0
Obese	2,7 \pm 0,3	3,1 \pm 0,3	0,5 \pm 0,2	1,3 \pm 0,4

Um in der Schlussrechnung den Anteil des renalen Glukoseverlustes bilanzieren zu können, wurde die Netto-Glukoseausscheidung berechnet (Tabelle III-7). Während bei den schlanken Ratten kein Glukoseverlust auftrat, verloren die obesen Tiere 0,8 mg Glukose über die Nieren.

Tabelle III-8 Menge des renalen Netto-Verlustes an Glukose, 6 Stunden nach Glukosebelastung bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese, n=8.

Gruppe	Harn-Glukose [mg]
schlank	0,0
obese	0,8

III.2.4 oGTT interindividuell

Die Körpermasse und die applizierte Glukosemenge des für die interindividuelle oGTT Studie verwendeten Tierkollektivs sind in Tabelle III-8 aufgeführt. Um den direkten Vergleich mit einer Stoffwechsellage bei gefütterten Bedingungen zu erlauben, wurde die Versuchsgruppe mit einer zusätzlichen Kontrolle (Nahrung ad libitum) erweitert.

Tabelle III-9 Körpermasse und applizierte Glukosemenge der jeweiligen Satellitengruppe in der interindividuellen oGTT-Studie. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8.

Zeitfenster/ Gruppe	Körpermasse [g]		Applizierte Glukose [mg]	
	schlank	obese	schlank	obese
0 min	207 \pm 4	290 \pm 6		
30 min	191 \pm 4	288 \pm 4	383 \pm 8	576 \pm 8
60 min	205 \pm 4	281 \pm 4	411 \pm 7	562 \pm 8
120 min	206 \pm 3	279 \pm 7	412 \pm 5	559 \pm 14
180 min	201 \pm 6	286 \pm 4	401 \pm 11	572 \pm 8
Kontrolle (gefüttert)	216 \pm 4	318 \pm 6		

III.2.4.1 Metabolische Parameter

Zur Demonstration der durch den oGTT verursachten Stoffwechseländerungen wurden verschiedene Serumparmeter (III.2.4.1.a) bestimmt.

III.2.4.1.a Blut/Serum

Nach Glukosegabe stieg die Blutglukose (Abb. III-19, A) bei den schlanken ZDF-Ratten mit einem Nüchtern-Wert von 4,4 mmol/l auf einen Wert von 8,1 mmol/l innerhalb von 30 Minuten an, um dann bis Versuchsende wieder langsam auf 6,1 mmol/l abzufallen. Die Blutglukose der obesen Tiere lag mit einem Nüchtern-Wert von 8,2 mmol/l bereits auf einem höheren Level, erreichte ebenfalls nach 30 min sein Maximum (15 mmol/l) und sank gegen Ende des Versuchs leicht unter den Ausgangswert. Die Werte der Blutglukose in den gefütterten Gruppen unterschieden sich signifikant voneinander (schlank: 10,4 mmol/l, obese: 18,6 mmol/l), ebenso die Insulinspiegel (Abb. III-19, B): 2,2 ng/ml (schlank) und 7,0 ng/ml (obese). Nach Glukosebelastung stiegen die Insulinwerte bei den schlanken ZDF-Ratten nur geringfügig von 0,6 ng/ml auf 0,9 ng/ml binnen 30 Minuten an und blieben bis zur 3. Stunde auf diesem Niveau. Die obese Gruppe zeigte einen zweiphasigen Verlauf; nach einem kleinen Peak von 3,9 ng/ml 30 Minuten nach Glukosegabe stiegen die Insulinspiegel erneut auf 4,7 ng/ml bis zum Ende des oGTT an.

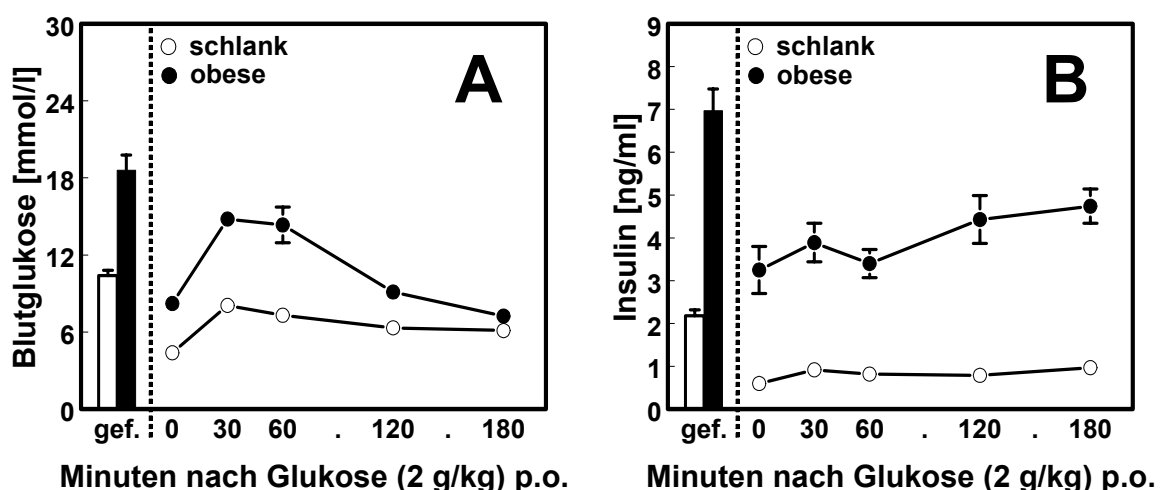


Abb. III-19 Blutglukose (A)- und Insulinspiegel (B) der 8 Wochen alten, gefütterten und gehungerten (mit Glukosebelastung) ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Die Laktatspiegel (Abb. III-20) der beiden Gruppen zeigten einen synchronen Verlauf, wobei die Werte der obesen Tiere über den Versuchszeitraum stets parallel auf einem höheren Niveau lagen. Bei den schlanken Tieren erhöhten sich die Werte von 1,3 mmol/l auf 2,2 mmol/l ($t=30$ min) und fielen bis zum Ende des Tests wieder auf das ursprüngliche Niveau zurück. Bei den obesen Tieren erhöhte sich innerhalb von 30 Minuten der Laktatwert von 3,2 mmol/l ($t=0$ min) sprunghaft auf 5,7 mmol/l und sank dann kontinuierlich auf 2,4 mmol/l zum Ende hin ab. Unter gefütterten Bedingungen lagen die Werte der obesen Tiere mit 3,9 mmol/l über denen der schlanken Ratten (1,7 mmol/l).

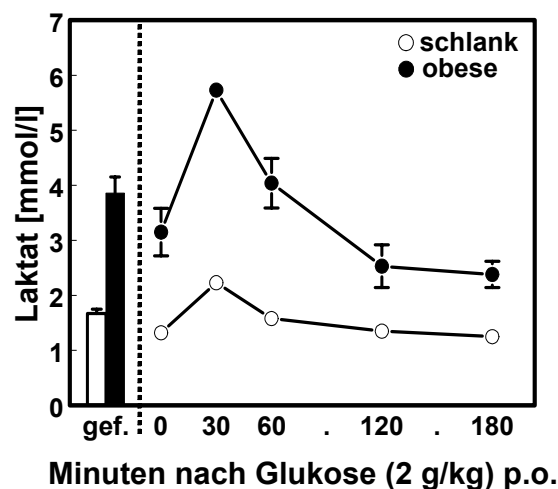


Abb. III-20 Verlauf von Laktat während des oGTT, vergleichend mit dem Laktatspiegel unter gefütterten Bedingungen bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Die Spiegel der FFS (Abb. III-21, A) waren sowohl unter gefütterten Bedingungen als auch während des oGTT bei beiden Gruppen auf ähnlichem Niveau. Die Nüchtern-Werte der schlanken Ratten waren mit 0,9 mmol/l etwas höher als die der obesen (0,7 mmol/l). Binnen 30 Minuten nach Glukosegabe fielen die FFS schnell auf 0,4 mmol/l bzw. 0,3 mmol/l bei den obesen Tieren ab und bewegten sich am Ende des Versuchs bei 0,7 mmol/l, im Falle der obesen Gruppe bei 0,6 mmol/l. Die TG (Abb. III-21, B) des obesen Kollektivs waren im Vergleich zur schlanken Gruppe unter gefütterten Bedingungen um den Faktor 10 erhöht. Während die TG der schlanken ZDF-Ratten sich konstant bei Werten von $\pm 0,2$ mmol/l bewegten, zeigten die obesen Tiere, ausgehend von 5 mmol/l 30 min nach Applikation, einen kurzzeitigen Abfall auf 3,9 mmol/l, um dann zum Ende des Versuchs wieder annähernd den Ausgangswert zu erreichen.

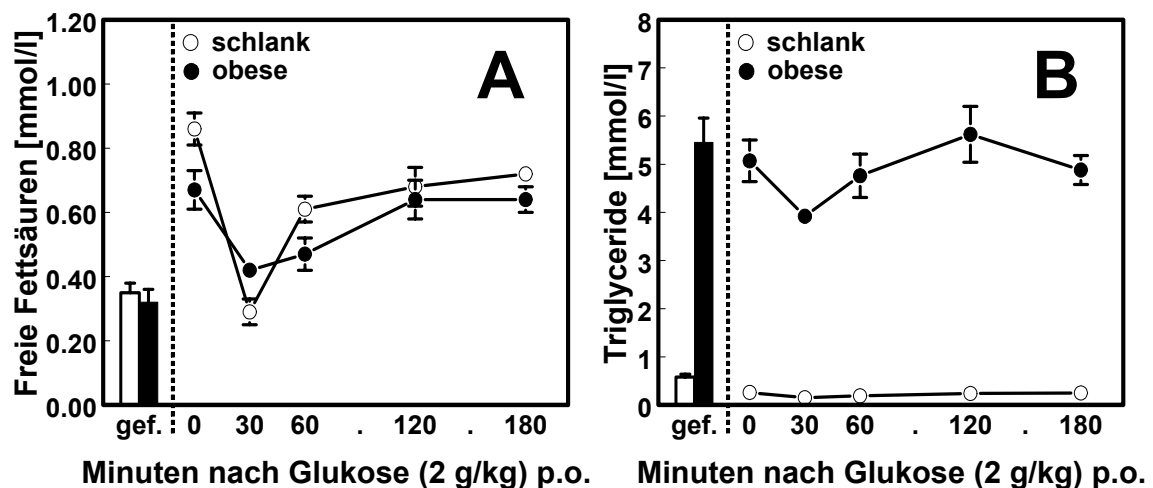


Abb. III-21 Verlauf von freien Fettsäuren (A) und Triglyceriden (B) während des oGTT, vergleichend mit den Werten unter gefütterten Bedingungen, bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Die Ketonkörper (Abb. III-22) der gefütterten Gruppen lagen, mit 257 μ mol/l bei der schlanken Gruppe bzw. mit 331 μ mol/l bei den obesen Ratten, auf vergleichbarem Niveau. Eine halbe Stunde nach Glukosebelastung zeigte sich bei den schlanken ZDF-Ratten ein abrupter Abfall von 1708 μ mol/l auf 167 μ mol/l, nach diesem negativen Peak erhöhten sich die Werte nach 2,5 h wieder auf einen Wert von 1104 μ mol/l. Die Ketonkörperwerte der obesen Ratten verliefen etwas unterhalb der Werte unter gefütterten Bedingungen und wiesen keinen solch ausgeprägten Abfall auf.

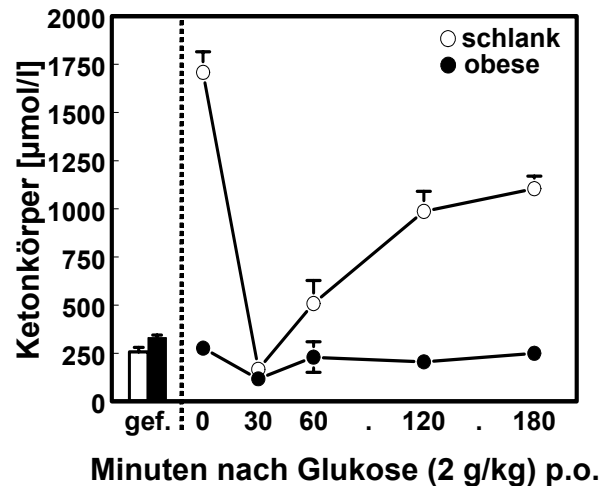


Abb. III-22 Verlauf von Ketonkörpern während des oGTT, vergleichend mit den Werten unter gefütterten Bedingungen, bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Die Cholesterinwerte (Abb. III-23) der schlanken Tiere waren im gefütterten Zustand mit 2,4 mmol/l etwas niedriger als die der obesen Gruppe mit 2,7 mmol/l. Nach Einnahme der Glukoselösung fiel bei den schlanken ZDF-Ratten Cholesterin in geringem Maße von 2,5 mmol/l (t=0 min) auf 2,3 mmol/l zum Ende des Versuchs. Die Werte der obesen Testgruppe änderten sich nach der Glukosebelastung kaum und bewegten sich bis zum Ende des oGTT bei Werten um \pm 2,6 mmol/l.

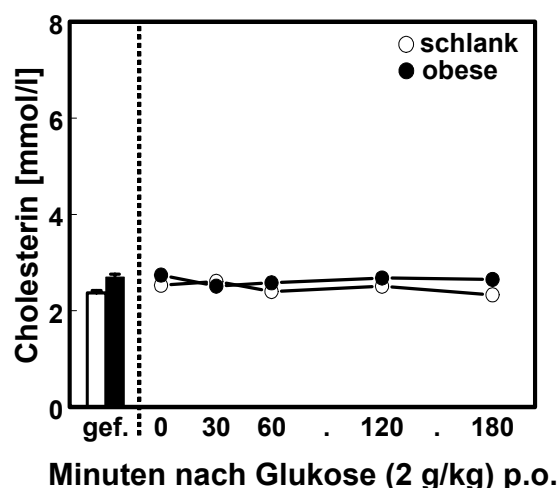


Abb. III-23 Verlauf von Cholesterin während des oGTT, vergleichend mit dem Cholesterinspiegel unter gefütterten Bedingungen bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

III.2.4.1.b Organparameter

Um den Anteil der gespeicherten Glukose zu quantifizieren, wurde während des oGTT freie Glukose, Leber- und Muskelglykogen bestimmt. Desweiteren wurden G6P, F6P und ATP in Leber (hier zusätzlich Triglyceride) und Muskel bestimmt, um die Stoffwechselveränderungen in den beiden Organen aufzuzeigen.

Die Leberglykogenwerte (Abb. III-24, A) bewegten sich, gehungert wie gefüttert, bei beiden Gruppen auf signifikant unterschiedlichem Niveau. Unter gefütterten Bedingungen war der Glykogengehalt pro Gramm Lebermasse bei den obesen Tieren mit 55 mg/g um einen Faktor 2,2 höher als bei den schlanken Tieren. Nach dem Hungern war das Leberglykogen bei den schlanken Ratten (0,1 mg/g) nahezu erschöpft und erhöhte sich nach Applikation der Glukose auf 1,0 mg/g (t=180 min). Das Leberglykogen der obesen Tiere lag nüchtern mit 42 mg/g um ein Vielfaches höher (Faktor 420) und nahm nach Glukosebelastung bis zum Versuchsende um weitere 6 mg/g zu. Der Gehalt an freier Glukose in der Leber (Abb. III-24, B) lag bei Fütterung in der schlanken Gruppe mit 3 mg/g um 62% niedriger als bei der obesen Gruppe mit 4,6 mg/g. Zu Versuchsbeginn lag die freie Glukose des schlanken Kollektivs bei 0,7 mg/g und stieg bis zum Zeitfenster t=180 min auf Werte von 1,7 mg/g an. Bei den obesen Tieren zeigte sich anfänglich eine kurzfristige Steigerung, die Endwerte lagen mit 2,7 mg/g jedoch im Bereich der Nüchtern-Werte von 2,9 mg/g.

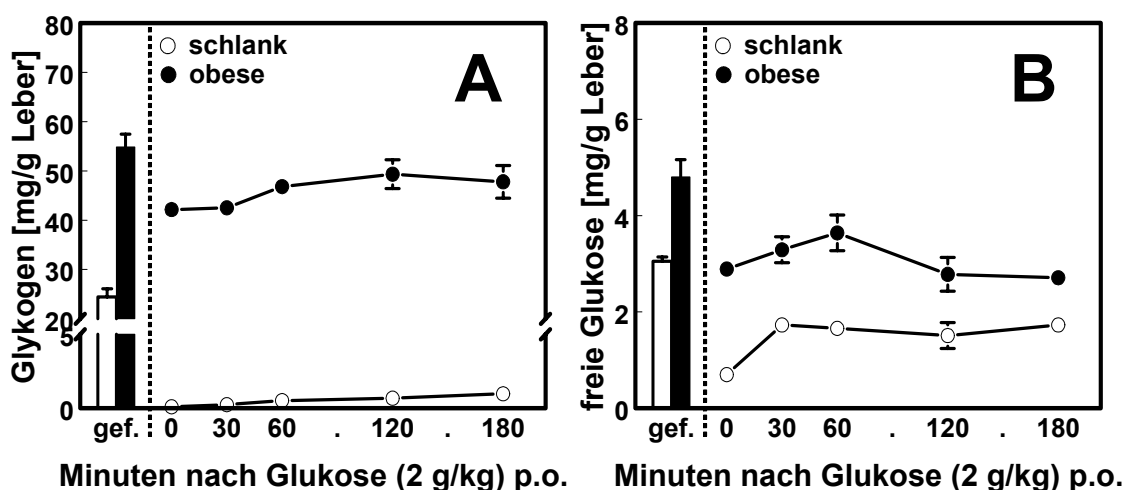


Abb. III-24 Spiegel von Leberglykogen (A) und freier Glukose (B) pro Gramm Feuchtgewicht in der Leber während des oGTT, vergleichend mit dem Gehalt unter gefütterten Bedingungen bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Ergebnisse

Ausgehend von der Lebermasse (Tabelle III-9) wurde der Gesamtfluss an Glukoseäquivalenten berechnet.

Tabelle III-10 Lebermasse und geschätzte Skelettmuskelmasse der jeweiligen Satellitengruppe in der interindividuellen oGTT-Studie. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8.

Zeitfenster	Lebermasse [g]		Skelettmuskelmasse [g]	
	schlank	obese	schlank	obese
0 min	5,7 \pm 0,1	12,2 \pm 0,2	108 \pm 2	116 \pm 2
30 min	5,2 \pm 0,3	12,8 \pm 0,4	103 \pm 2	115 \pm 2
60 min	5,7 \pm 0,1	12,3 \pm 0,2	96 \pm 2	112 \pm 2
120 min	5,8 \pm 0,1	12,3 \pm 0,5	103 \pm 2	112 \pm 3
180 min	5,6 \pm 0,2	12,9 \pm 0,3	100 \pm 1	114 \pm 2

Die Skelettmuskelmasse wurde auf 50% (schlank) bzw. auf 40% (obese) der Körpermasse der Versuchstiere geschätzt (Even et al., 2001).

Das Leberglykogen (Abb. III-25, A) erhöhte sich bei den schlanken ZDF-Ratten von 0,6 mg (t=0 min) auf 5,5 mg (t=180 min). Bei den obesen Tieren nahm die Glykogenmenge von 516 mg bis zum letzten Messwert um weitere 101 mg zu. Bis zum Ende des oGTT betrug der Gehalt an freier Glukose (Abb. III-25, B) in der Leber der schlanken ZDF-Ratten 9,8 mg im Vergleich zum Anfangswert (4 mg), während bei den obesen Tieren kein Anstieg erfolgte.

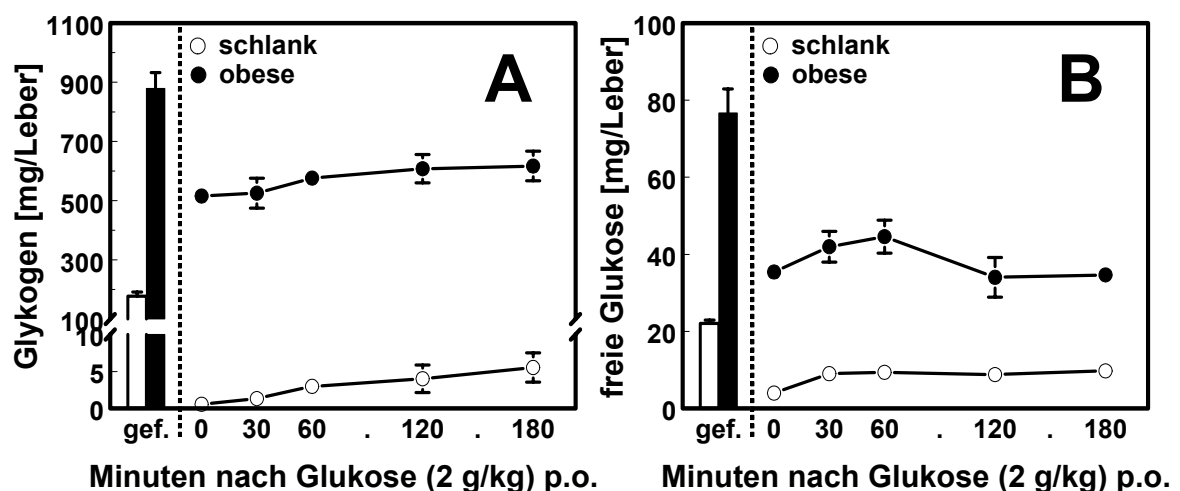


Abb. III-25 Spiegel von Leberglykogen (A) und freier Glukose (B) in der Leber während des oGTT, vergleichend mit dem Gehalt unter gefütterten Bedingungen bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Das Muskelglykogen (Abb. III-26) der gefütterten Gruppen war mit 3,6 mg/g Muskel bei den schlanken Tieren und mit 3,7 mg/g Muskel bei den obesen Ratten nahezu identisch. Im Falle der schlanken Gruppe betrug der Glykogengehalt zu Versuchsbeginn mit 1,7 mg/g Muskel etwa die Hälfte des gefütterten Kollektivs; nach Glukosegabe stieg der Anteil von Glykogen in der Muskulatur kontinuierlich bis auf 2,6 mg/g Muskel an. Auch in der obesen Versuchsgruppe nahm Glykogen im Verlauf des oGTT bis auf einen Endwert von 4,1 mg/g Muskel zu.

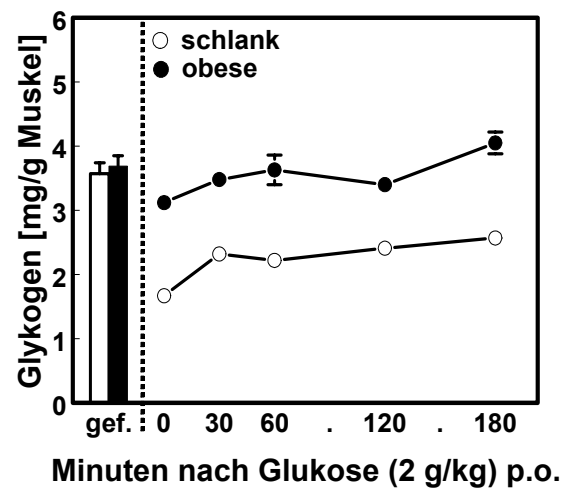


Abb. III-26 Spiegel von Muskelglykogen während des oGTT, vergleichend mit dem Gehalt unter gefütterten Bedingungen bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Ausgehend von der geschätzten Skelettmuskelmasse (Tabelle III-9) wurde für dieses Kompartiment der Gesamtfluss an Glukoseäquivalenten (Abb. III-27) berechnet.

Es ergab sich, dass sich der Glykogengehalt der Skelettmuskelmasse zwischen der ersten und letzten Messung um 84 mg (schlank) bzw. um 103 mg (obese) erhöhte.

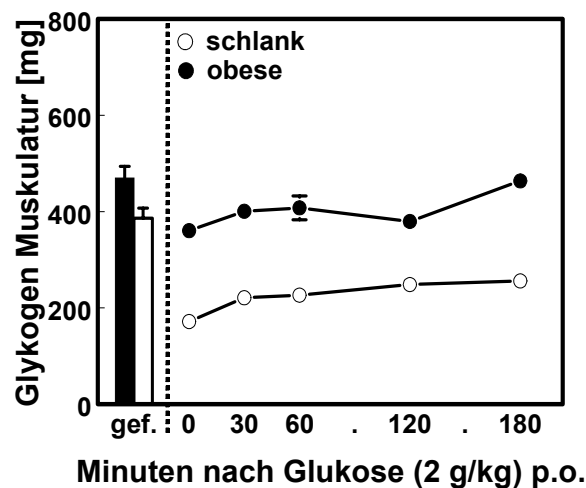


Abb. III-27 Geschätzter Glykogengehalt der Skelettmuskulatur während des oGTT, sowie Werte unter gefütterten Bedingungen bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Für die zusammenfassende Bilanzierung (III.2.4.2) wurde der Netto-Glukosefluss (Tabelle III-10) bis zum Versuchsende in die o.g. Kompartimente berechnet.

Tabelle III-11 Netto-Glukosefluss in Leber und Muskel bis zum Ende des oGTT bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese.

Netto-Glukosefluss	schlank	obese
Freie Glukose, Leber [mg]	6	0
Glykogen, Leber [mg]	5	101
Glykogen, Muskel [mg]	84	103

Die G6P Gehalte in der Leber (Abb. III-28, A) lagen bei den gefütterten Gruppen mit 369 nmol/g Leber bei der schlanken Gruppe und mit 410 nmol/g Leber in der obesen Gruppe in einem engen Bereich. Umgekehrt verhielt es sich nach der 18-stündigen Hungerphase, hier lagen die Werte der schlanken Tiere mit 30 nmol/g Leber signifikant unter dem Anfangswert der obesen Tiere von 369 nmol/g Leber. Der G6P Gehalt bei den schlanken Ratten erhöhte sich bis Versuchsende um den Faktor 2,5, wohingegen sich die Werte bei der obesen Gruppe nicht änderten.

Die F6P Werte (Abb. III-28, B) lagen gefüttert bei 59 nmol/g Leber (schlank) bzw. bei 93 nmol/g Leber (obese). Während bei den schlanken Tieren F6P nach der Glukosebelastung stets unterhalb der Nachweisgrenze blieb, lagen die F6P Werte bei den obesen ZDF-Ratten während des Tests bei ± 88 nmol/g Leber.

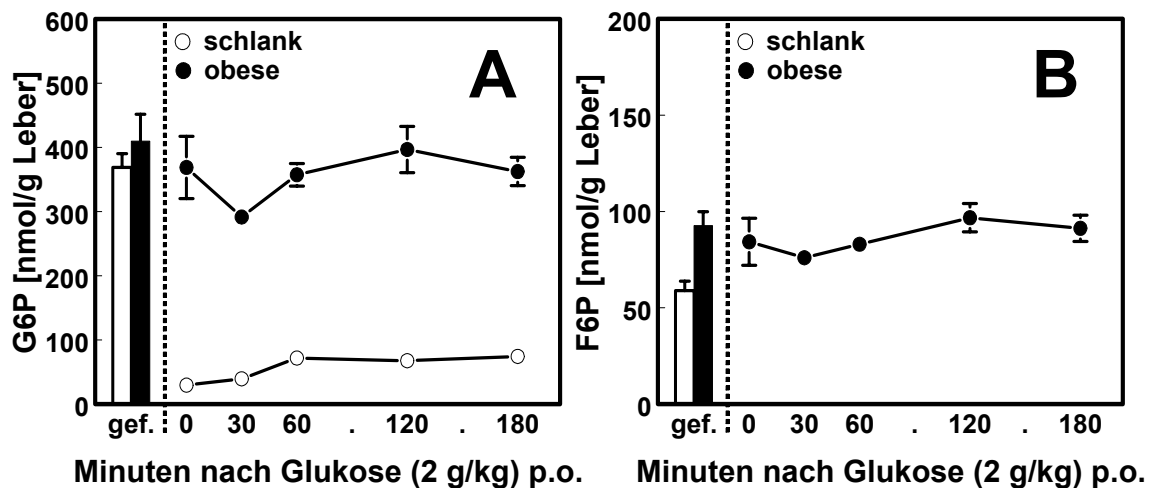


Abb. III-28 Spiegel von G6P (A) und F6P (B) in der Leber während des oGTT, vergleichend mit dem Gehalt unter gefütterten Bedingungen bei 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Der Verlauf von G6P (Abb. III-29, A) und F6P (Abb. III-29, B) im Muskel während des oGTT ähnelte sich sehr. Sowohl bei schlanken als auch bei obesen Ratten änderten sich die beiden Metabolite nicht wesentlich nach der Glukosebelastung. G6P und F6P differierten unter gefütterten Bedingungen nicht zwischen schlanken und obesen Tieren.

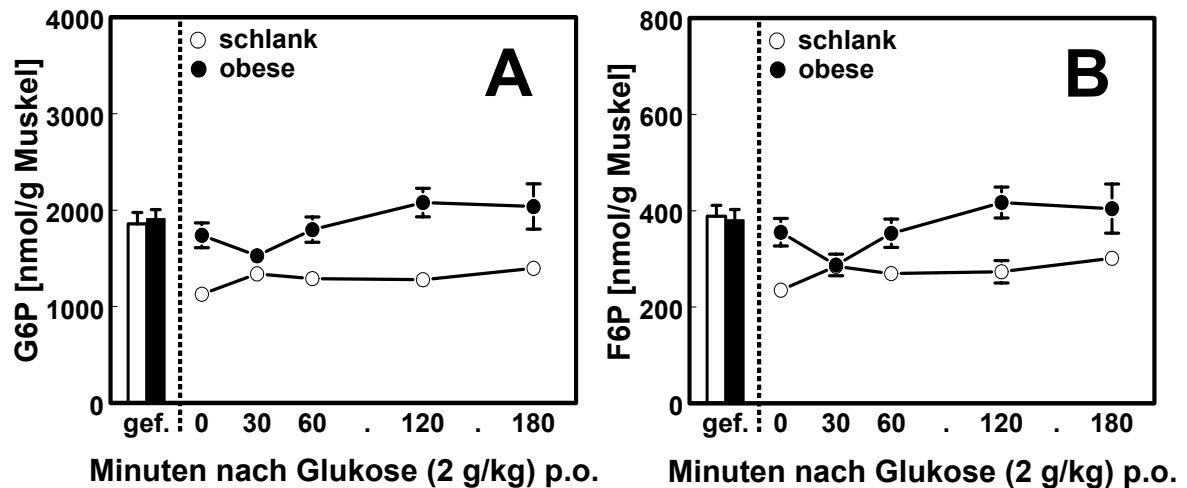


Abb. III-29 Spiegel von G6P (**A**) und F6P (**B**) in der Muskulatur während des oGTT, sowie Werte unter gefütterten Bedingungen bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Die ATP-Gehalte in der Leber (Abb. III-30) bei schlanken (139 nmol/g Leber) und obesen (160 nmol/g Leber) Tieren differierten unter gefütterten Bedingungen nur geringfügig. Der Verlauf nach Glukosegabe verlief spiegelbildlich. Bei den schlanken ZDF-Ratten stiegen die Werte von Versuchsbeginn mit 101 nmol/g Leber bis zum Versuchsende auf 135 nmol/g Leber, wohingegen bei der obesen Gruppe die Werte von 198 nmol/g Leber (t=0 min) auf 158 nmol/g Leber zum Ende hin abfielen.

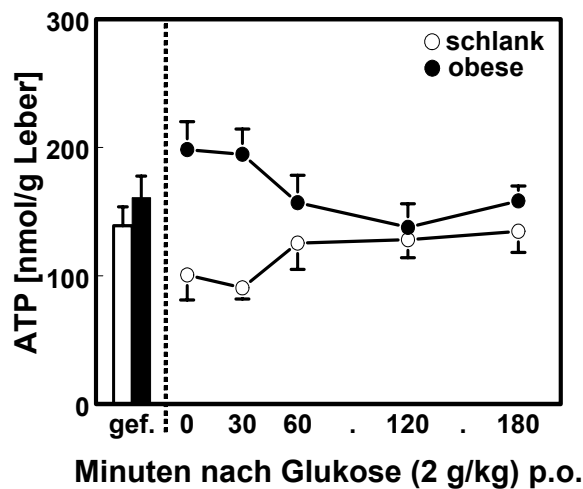


Abb. III-30 ATP-Menge in der Leber während des oGTT, vergleichend mit den Werten unter gefütterten Bedingungen bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert.

Die ATP-Konzentrationen im Muskel (Abb. III-31) betrugen bei den gefütterten, schlanken Tieren 2384 nmol/g Muskel und die Menge an Muskel-ATP in der gefütterten, obesen Gruppe war mit 2184 nmol/g Muskel etwas geringer. Sowohl in der schlanken als auch in der obesen Testgruppe nahm ATP von der Glukosegabe bis zum Versuchsende geringgradig zu. Die Zunahme betrug 176 nmol/g (schlank) bzw. 130 nmol/g (obese).

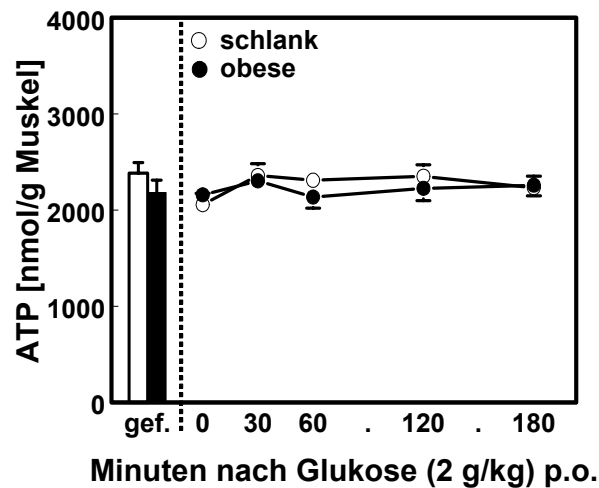


Abb. III-31 ATP-Menge in der Leber während des oGTT, vergleichend mit den Werten unter gefütterten Bedingungen bei 8 den Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefütterte (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Die Lebertriglyceride (Abb. III-32) waren bei den gefütterten, obesen Tieren mit 27 mg/g nahezu um den Faktor 6 höher als bei der schlanken Vergleichsgruppe. Während dem oGTT ließ sich bei beiden Gruppen kein besonderes Muster im Verlauf der TG erkennen. Bei dem schlanken Kollektiv betrug der Wert zum Zeitpunkt t=0 min 7 mg/g und fiel nach Ablauf von drei Stunden diskontinuierlich auf 5,3 mg/g Leber ab. Bei den obesen Tieren lag zu Beginn des Tests der Gehalt an TG mit 21 mg/g Leber um ein Dreifaches höher, verglichen mit den schlanken ZDF-Ratten und endete nach einem wellenförmigen Verlauf mit diesem Wert.

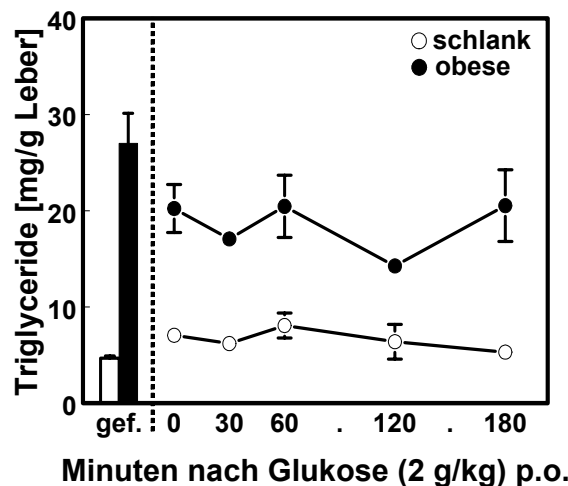


Abb. III-32 Triglyceridspiegel in der Leber während des oGTT, vergleichend mit den Werten unter gefütterten Bedingungen bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

III.2.4.2 Bilanzierung

Bei der Bilanzierung wurde berechnet, wie viel der applizierten Glukosemenge letztendlich oxidiert, über den nicht-oxidativen Stoffwechselweg in Leber und Muskel gespeichert bzw. über die Nieren ausgeschieden wurde. Die Netto-KHO, der Netto-Harnglukoseverlust und der Netto-Glukosefluss in die Kompartimente Leber und Muskel wurden ins Verhältnis zu der applizierten Glukosemenge (Tabelle III-5, 8) gesetzt. Die jeweiligen Anteile wurden in der Abb. III-33 und Abb. III-34 als Prozentwerte angegeben.

schlanke ZDF-Ratten

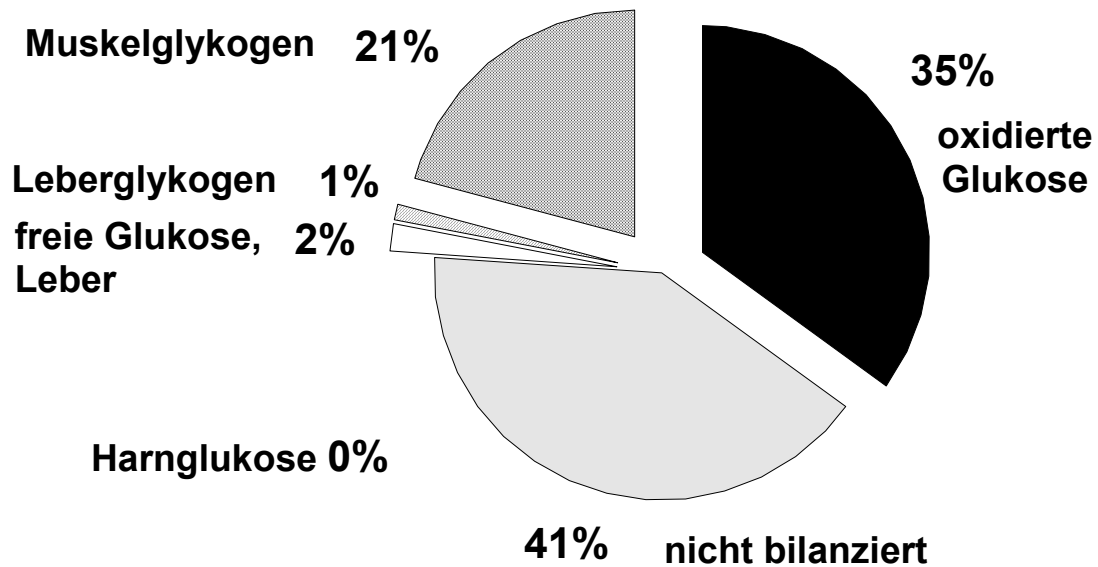


Abb. III-33 Prozentuale Anteile oxidiertener Glukose, Muskelglykogen, Leberglykogen, freier Glukose (Leber) und Harnglukose an der applizierten Glukosemenge bei den 8 Wochen alten, schlanken ZDF-Ratten.

obese ZDF-Ratten

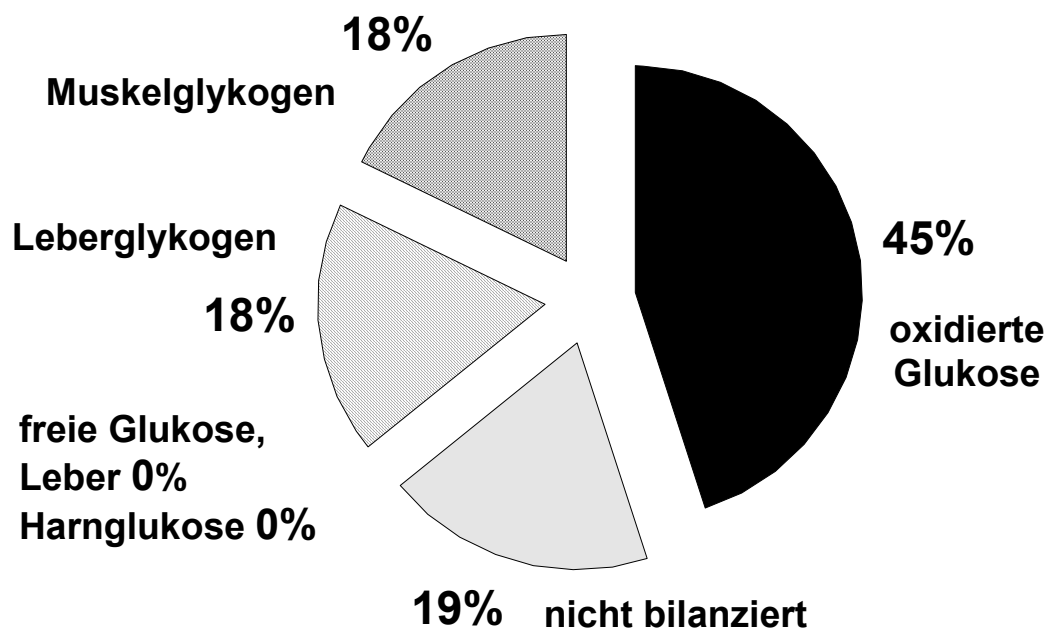


Abb. III-34 Prozentuale Anteile oxidiertener Glukose, Muskelglykogen, Leberglykogen, freier Glukose (Leber) und Harnglukose an der applizierten Glukosemenge bei den 8 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten.

Ergebnisse

Die Menge an oxidiertem Glukose lag mit 35% bei schlanken bzw. 45% bei obesen Tieren höher als der in Leber und Muskel gespeicherte Anteil. Während der Wert für Muskelglykogen zwischen schlank (21%) und obese (18%) vergleichbar war, unterschieden sich beide signifikant im Leberglykogen (schlank: 1%, obese: 18%). In der Bilanzierung konnten 41% (schlank) bzw. 19% (obese) der applizierten Glukose nicht erfasst werden.

Die Tabelle III-12 zeigt zusätzlich eine Gegenüberstellung der Bilanzierung für schlanke und obese ZDF-Ratten.

Tabelle III-12 Prozentuale Anteile oxidierteter Glukose, Muskelglykogen, Leberglykogen, freier Glukose (Leber) und Harnglukose an der applizierten Glukosemenge bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten (oGTT: intra-individuell, interindividuell; schlank vs. obese).

	schlank				obese			
	KGW (g)	appl. Glukose (mg)	Glukose pro Kompartiment		KGW (g)	appl. Glukose (mg)	Glukose pro Kompartiment	
			absolut (mg)	relativ (%)			absolut (mg)	relativ (%)
intra-individuell	203	405			236	471		
KHO			142	35			210	45
Harnglukose			0	0			0	0
inter-individuell	191-206	383-412			279-288	562-576		
Muskelglykogen			81-87	21			101-103	18
Leberglykogen			4	1			101-103	18
Leber: freie Glukose			7-8	2			0	0
nicht-bilanziert			159-169	41			107-109	19

III.2.4.3 Biochemische Parameter

Nach den in vivo Studien wurde die Regulation des PDH-Komplexes ex vivo anhand der PDH-Aktivität und der PDK4 Expression im Leber- und Muskelgewebe untersucht. Die PDH-Aktivität und die PDK4-Proteinmenge wurden zunächst im Grundzustand (gefüttert vs. gehungert bzw. schlank vs. obese) und anschließend während des oGTT bestimmt.

III.2.4.3.a PDH-Aktivität

Die Enzymaktivität im Lebergewebe (Abb. III-35, A) gefütterter Tiere (schlank: 3,0 mU/mg, obese: 2,7 mU/mg) lag um den Faktor 1,8 (schlank) bzw. 2,2 (obese) höher als bei den gehungerten Tieren (schlank: 1,7 mU/mg, obese: 1,2 mU/mg).

Die Aktivitäten im Muskelgewebe (Abb. III-35, A) bewegten sich insgesamt auf einem höheren Niveau. Der Substratumsatz war bei gefütterten Tieren in der Muskulatur ca. zweifach höher als in der Leber (schlank: 8,2 mU/mg, obese: 6,9 mU/mg).

Zusätzlich wurde die Gesamtaktivität (Abb. III-35, B) durch Zugabe von λ -PPase (siehe Kapitel II.2.2.a) bestimmt. Hier zeigte sich, dass im Lebergewebe die PDH-Aktivität bei obesen Tieren ca. 20% über der der schlanken Ratten lag, während in der Muskulatur zwischen diesen Gruppen keine Unterschiede zu erkennen waren.

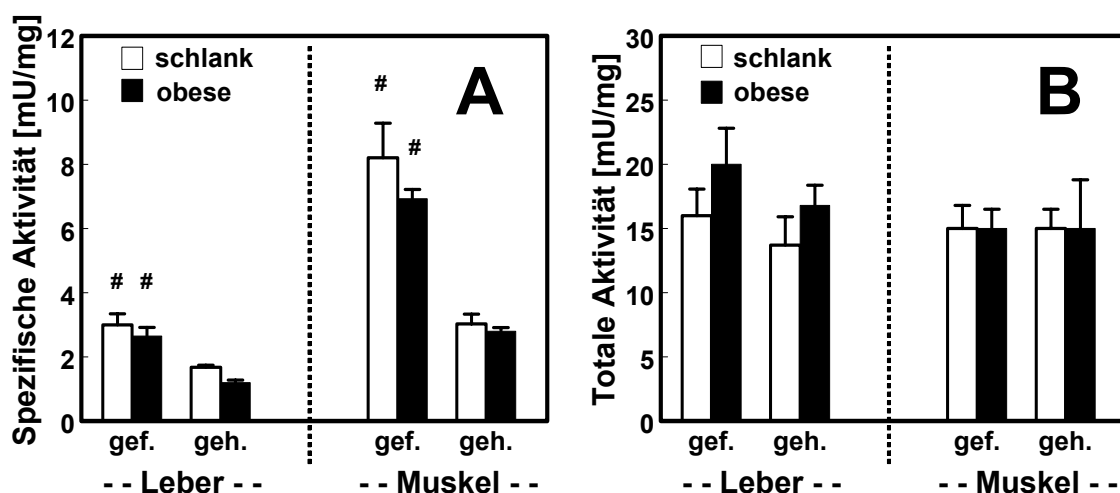


Abb. III-35 Vergleich der PDH-Aktivität unter gefütterten und gehungerten Bedingungen (A), sowie nach vollständiger Aktivierung (B) bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten in Leber und Muskulatur, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$, $\#P < 0,05$ vs. gehungert; gef.: gefüttert, geh.: gehungert. Die Aktivität wurde wie unter II.2.2.a beschrieben bestimmt.

Mit Hilfe der Gesamtaktivität ließ sich der prozentuale Anteil der PDH-Aktivität (Abb. III-36) berechnen.

Es zeigte sich, dass sich die Werte der Leber-PDH obeses Ratten aufgrund der höheren Totalaktivität stärker von denen der schlanken Tiere unterschieden.

Für beide Gewebe ergab sich, sowohl bei schlanken als auch bei obesen Tieren, ein Aktivitätsverhältnis von 2:1 für gefütterte vs. gefastete Stoffwechsellaage.

In der Leber war unter Fütterung die PDH lediglich zu 25% (schlank) bzw. 14% (obese) aktiv, wohingegen die Anteile im Muskel bei 79% (schlank) bzw. 73% (obese) lagen.

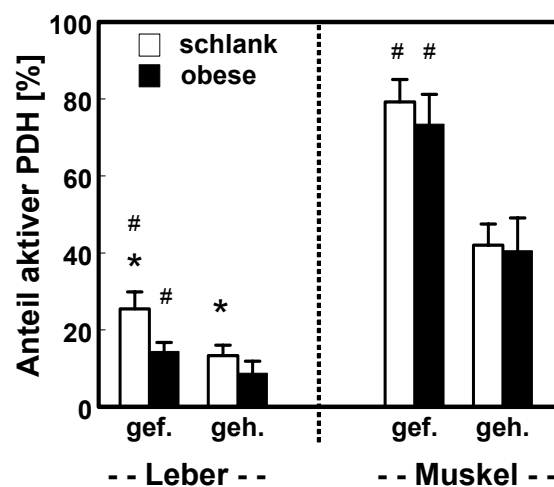


Abb. III-36 Prozentualer Anteil aktiver PDH unter Fütterung und Nahrungskarenz in Leber und Muskelgewebe bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$, $*P < 0,05$ vs. obese, $\#P < 0,05$ vs. gehungert; gef.: gefüttert, geh.: gehungert. Die Aktivität wurde wie unter II.2.2.a beschrieben bestimmt.

Um die Änderungen der PDH-Komplex-Aktivität nach Glukosebelastung zu erfassen, wurden aus dem oGTT für die Zeitfenster: 0 min, 60 min und 180 min von jeweils sechs Tieren die Enzymaktivitäten bestimmt (Abb. III-37).

Der Verlauf der PDH-Aktivität in der Leber (Abb. III-37, A) von schlanken und obesen Tieren war nahezu identisch, mit einem Maximum zur 60. Minute (schlank: 4,0 mU/mg, obese: 4,2 mU/mg). Zum Ende des oGTT flachte die Aktivitätskurve ab und erreichte mit 3,8 mU/mg (schlank) bzw. 3,3 mU/mg (obese) Werte, die etwas über den Messwerten unter gefütterten Bedingungen lagen (Abb. III-35, A). Die PDH-Aktivität im Muskelgewebe (Abb. III-37, B) bewegte sich insgesamt auf einem höheren Niveau, jedoch war der Verlauf mit dem in der Leber vergleichbar. Der Substratumsatz zum Zeitpunkt t=60 min (schlank: 14,6 mU/mg, obese: 13,1 mU/mg) war ca. dreifach höher als im Lebergewebe.

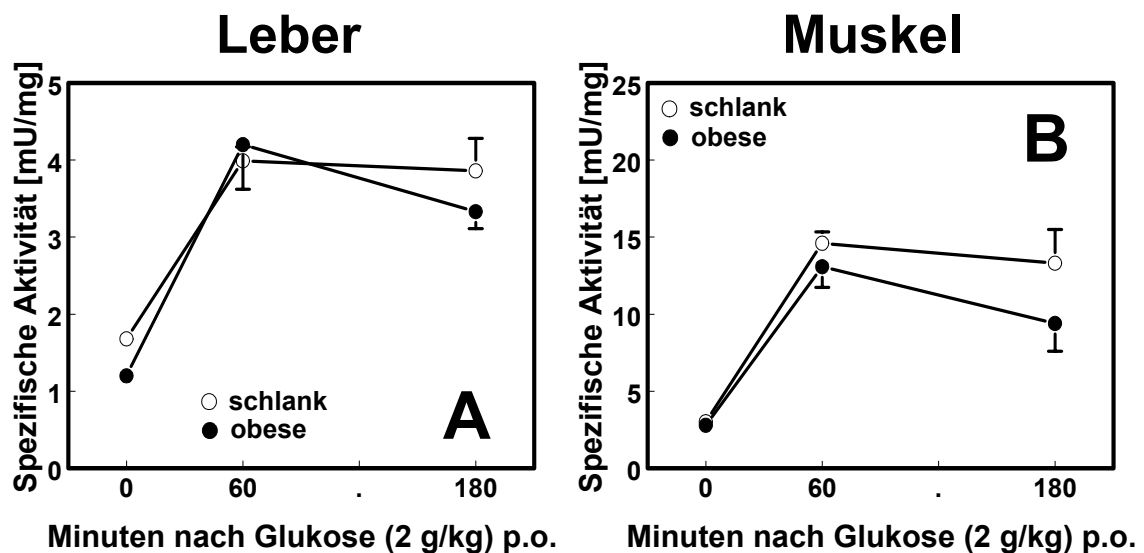


Abb. III-37 PDH-Aktivität während des oGTT bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten in Leber (A) und Muskulatur (B), schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=6 (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole). Die Aktivität wurde wie unter II.2.2.a beschrieben bestimmt.

III.2.4.3.b PDK4 – Proteinmenge

Um eine Beteiligung der PDK4 an der Regulation des PDH-Enzymkomplexes nach Glukosebelastung und unterschiedlicher Stoffwechsellage zu verstehen, wurde die Proteinmenge durch Western-Blot-Analyse (Abb. III-38) bestimmt.

Es zeigte sich eine Regulation der Proteinmenge, die in Leber und Muskulatur auf gleiche Weise erfolgte: nach der Hungerphase erhöhte sich in beiden Gruppen die Proteinmenge signifikant, dabei war sie bei den obesen Ratten stets in größerer Menge exprimiert als bei schlanken Tieren. Allerdings ergaben sich Unterschiede in den beiden Geweben; die PDK4-Proteinmenge war in der Leber signifikant höher als im Muskel.

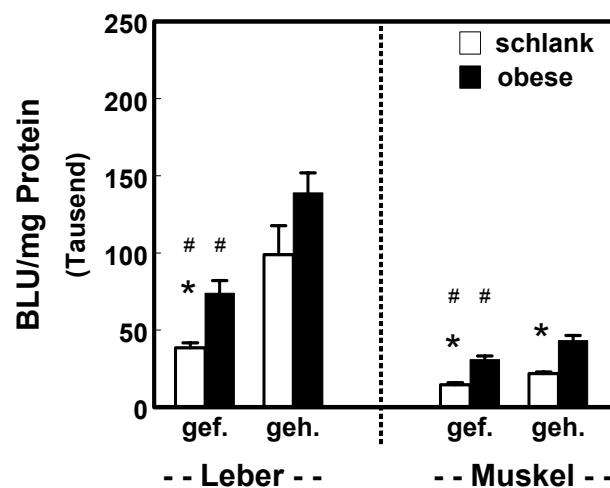


Abb. III-38 PDK4-Proteinmenge unter Fütterung und nach Nahrungskarenz in Leber und Muskelgewebe bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$, $*P < 0,05$ vs. obese, $\#P < 0,05$ vs. gehungert; gef.: gefüttert, geh.: gehungert. Die Western-Blot-Analyse wurde wie unter II.2.3.c/d beschrieben angefertigt.

Im Anschluss wurde die Proteinexpression während des oGTT untersucht. Nach Glukosegabe fiel, außer in der Leber der obesen Ratten, in allen Gruppen die PDK4-Proteinmenge kontinuierlich ab (Abb. III-39). Zwei Stunden nach Glukosegabe war die PDK4-Proteinmenge im Lebergewebe (Abb. III-39, A) der schlanken Ratten und in der Muskulatur (Abb. III-39, B) beider Versuchsgruppen, im Vergleich zu den Werten zu Versuchsbeginn, signifikant erniedrigt.

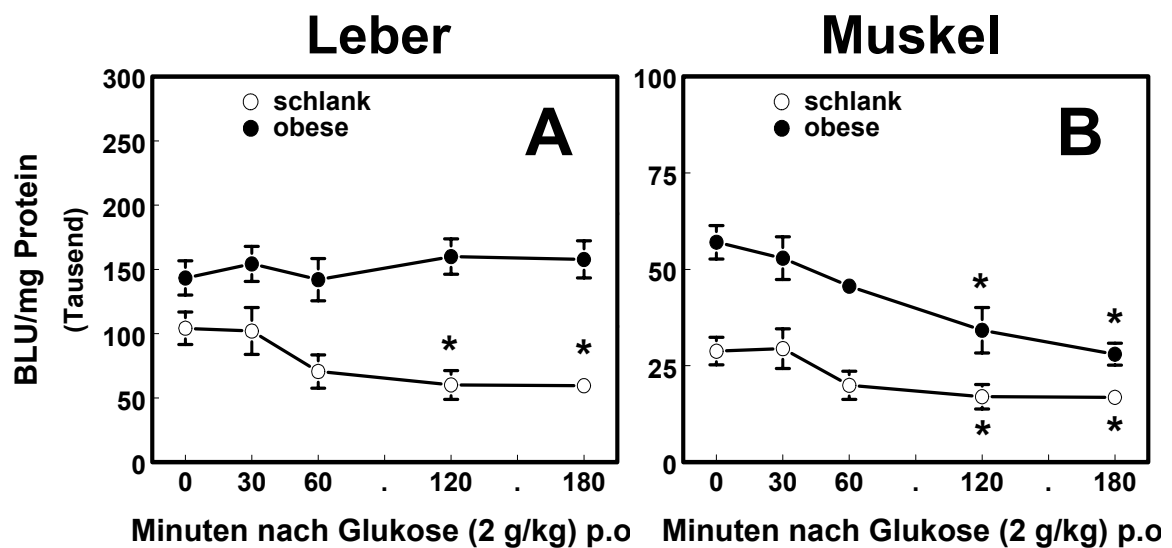


Abb. III-39 PDK4-Proteinmenge während des oGTT in Leber (A) und Muskelgewebe (B) bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$, $*P < 0,05$ vs. $t=0$ min. Die Western-Blot-Analyse wurde wie unter II.2.3.c/d beschrieben angefertigt.

III.2.4.3.c PDH E1 α/β - Proteinmenge

Von den gefütterten und gehungerten Tieren wurde jeweils auch die Proteinmenge vom Komplexbestandteil E1 untersucht, um festzustellen, ob auch der Enzymkomplex selbst, in Abhängigkeit von der Stoffwechselsituation (schlank vs. obese), einer Regulation unterliegt.

Da sich unter gefütterten und gehungerten Bedingungen die Expression von PDH-E1 α und β nicht änderte (Daten nicht gezeigt), beschränkt sich die Analyse auf die PDH-E1 Proteinmenge in Leber und Muskel bei gefütterten, schlanken und obesen Tieren (Abb. III-40). Der scheinbar höhere Anteil an alpha zu beta ist auf die höhere Spezifität des verwendeten Antikörpers für die alpha Untereinheit zurückzuführen (schriftliche Mitteilung: Prof. Dr. M.S. Patel, Department of Biochemistry, New York State University, Buffalo, NY, USA).

Die beiden Untereinheiten der PDH kamen in den untersuchten Geweben der obesen Tiere stets in höherer Menge vor (Faktor 1,3 bis 1,7) als in denen der schlanken ZDF-Ratten. Vergleicht man die Proteinmenge in Leber und Muskel, so bewegten sich diese auf ähnlichem Niveau, wobei PDH alpha und beta in der Muskulatur, insbesondere bei den obesen Tieren, über den Leberwerten lag.

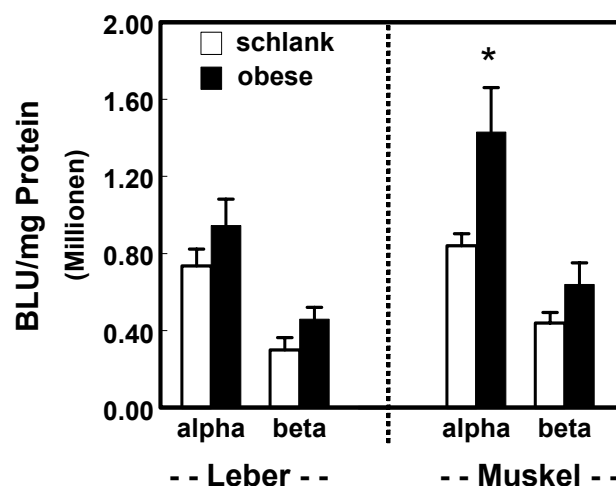


Abb. III-40 Menge an PDH-E1 α/β in Leber- und Muskelgewebe bei den 8 Wochen alten, gefütterten ZDF-Ratten, schlank vs. obese (Blot von Abb. III-38 rehybridisiert). Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$, * $P < 0,05$ vs. schlank. Die Western-Blot-Analyse wurde wie unter II.2.3.c/e beschrieben angefertigt.

III.3 oGTT bei 16 Wochen alten ZDF-Ratten

Die Körpermasse und applizierte Glukosemenge der für die intraindividuellen Studien verwendeten Tierkollektivs sind in Tabelle III-11 aufgeführt.

Tabelle III-13 Körpermasse und applizierte Glukosemenge der in den intraindividuellen oGTT-Studien verwendeten 16 Wochen alten, schlanken und obesen ZDF-Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8.

	Körpermasse [g]		Applizierte Glukose [mg]	
Gruppe	schlank	obese	schlank	obese
Kontrolle	319 \pm 9	390 \pm 23		
Glukose- belastung	334 \pm 8	445 \pm 19	668 \pm 16	891 \pm 37

III.3.1 oGTT intraindividuell - Blutglukoseprofil

Bei der Untersuchung der Glukosetoleranz wurde zunächst wieder mit dem Verlauf der Blutglukose nach Glukosegabe begonnen.

Im Verlauf der Blutglukose zeigte sich bei den schlanken (Abb. III-41, A) und obesen (Abb. III-41, B) Tieren ein ganz unterschiedliches Bild. In der schlanken Gruppe stieg die Blutglukose mit einem Nüchtern-Wert von 4,0 mmol/l auf 7,0 mmol/l (t= 90 min) an und erreichte zum Versuchsende wieder Ausgangsniveau. Die obesen ZDF-Ratten starteten bereits mit einem viel höheren Anfangswert von 10,9 mmol/l und reagierten mit einem signifikant höheren Anstieg auf 20,0 mmol/l (t=90 min). Die Blutglukose kehrte hier nach Ablauf von drei Stunden (16,2 mmol/l) nicht auf ihre ursprünglichen Werte zurück.

Im Vergleich zu den 8 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten, bei denen eine gestörte Glukosetoleranz vorlag, spiegelt sich im Verlauf der Blutglukose bei den 16 Wochen alten, obesen Tieren das Vorhandensein des bereits manifesten Diabetes wider.

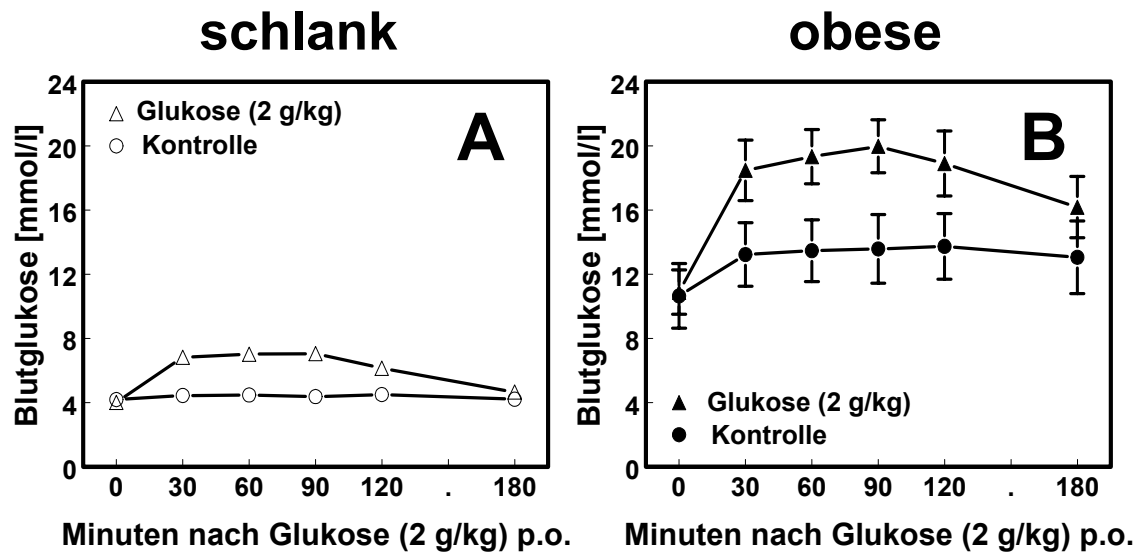


Abb. III-41 Blutglukoseprofil während des oGTT bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank (A) vs. obese (B). Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Um den Anstieg der Blutglukose betragsmäßig darzustellen, wurden für die Gruppen mit Glukosebelastung der Netto-Blutglukoseanstieg (Abb. III-42, A) und die Fläche unter der Kurve (Abb. III-42, B) berechnet.

Die obesen Ratten hatten im Vergleich zu den schlanken Tieren eine um den Faktor 3,3 höhere AUC.

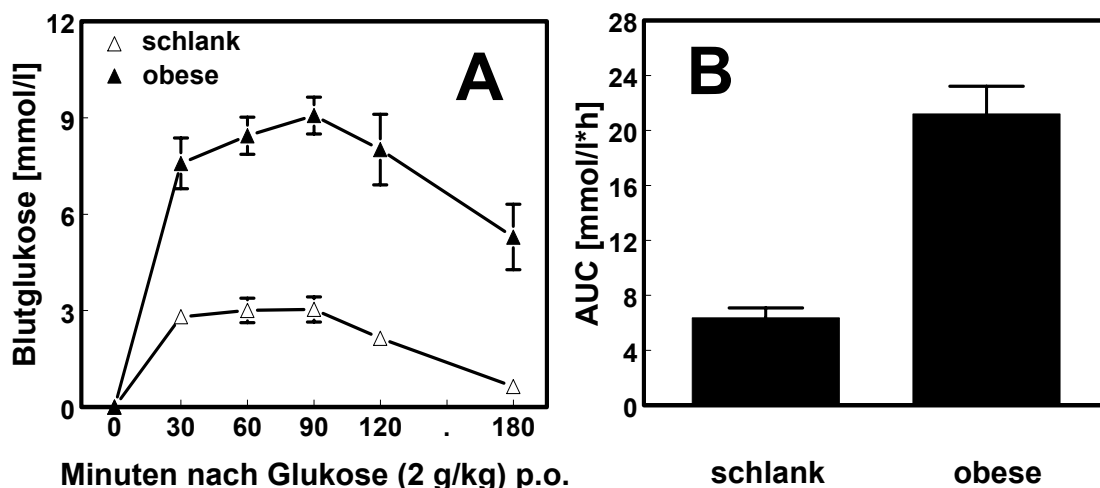


Abb. III-42 Verlauf des Netto-Blutglukoseanstieges (A) und der dazugehörigen AUC (B) nach der oralen Glukosebelastung bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

III.3.2 oGTT intraindividuell - Indirekte Kalorimetrie

Die folgenden Ergebnisse erläutern die Untersuchung des oxidativen Stoffwechsels während des oGTT mittels indirekter Kalorimetrie.

Unmittelbar nach der oralen Glukoselast stieg der RQ in der schlanken Gruppe (Abb. III-43, A) von 0,73 auf 0,80, blieb bei diesem Wert bis zur 2. Stunde und fiel zum Ende des Versuches wieder auf den Ausgangswert zurück. Der RQ der obesen Vergleichsgruppe (Abb. III-43, B) erreichte mit 0,85 ein höheres Maximum und sank ebenfalls bis zum Ende des oGTT wieder auf sein ursprüngliches Niveau (0,74) zurück.

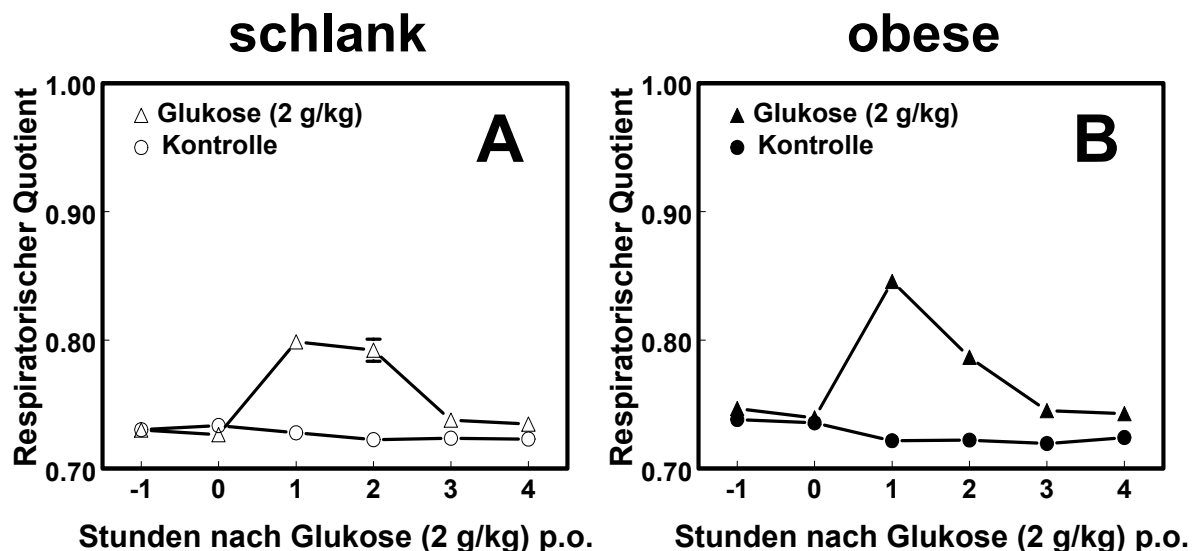


Abb. III-43 RQ-Profil während des oGTT bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank (**A**) vs. obese (**B**). Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=7-8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Nach 18 h Nahrungskarenz zum Zeitpunkt $t=0$ min lag die KHO der schlanken Tiere (Abb. III-44, A) bei $\pm 3,0$ mg/h/Tier und stieg nach Glukosegabe auf 136 mg/h/Tier an, lag eine Stunde später bei 95 mg/h/Tier und kehrte nach weiteren 60 min zu der basalen Substratoxidation vor Versuchsbeginn zurück. Die KHO in der obesen Gruppe (Abb. III-44, B) erreichte eine Stunde nach Applikation einen höheren Maximalwert von 238 mg/h/Tier, lag danach bei 92 mg/h/Tier ($t=2$ h) und endete mit einem Wert von 20 mg/h/Tier.

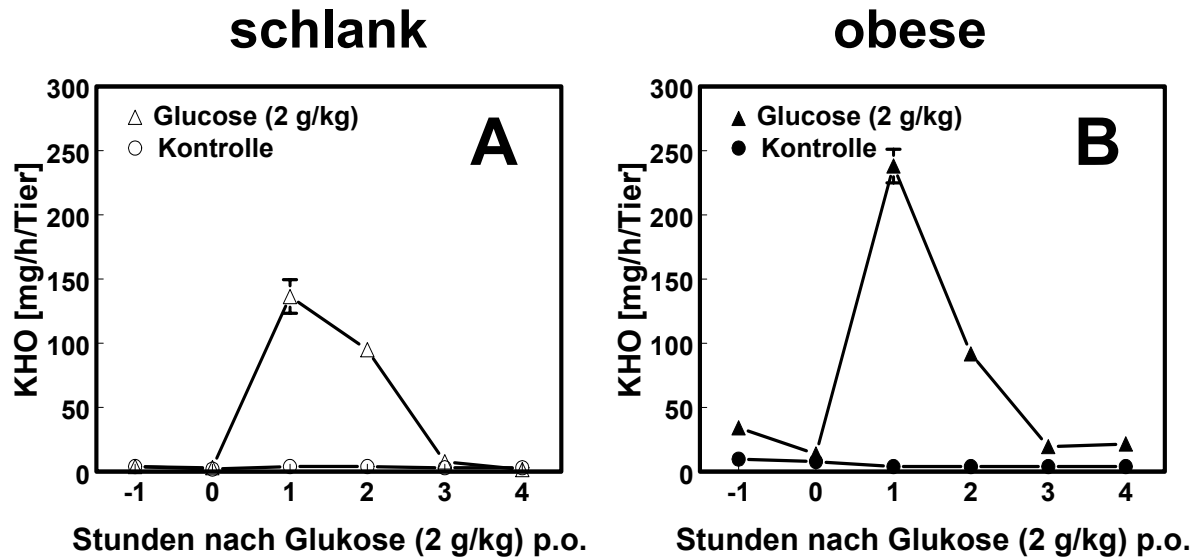


Abb. III-44 Menge an oxidiertem Glukose während des oGTT bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank (A) vs. obese (B). Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=7-8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Für die spätere Bilanzierung (III.3.4.2) wurde die Netto-KHO für das jeweilige Zeitfenster (Abb. III-45, A) sowie über den gesamten Versuchszeitraum (Abb. III-45, B) berechnet.

Die KHO (Abb. III-45, B) der obesen Tiere lag mit 310 mg/3h/Tier 35% höher als die der schlanken ZDF-Ratten (230 mg/3h/Tier).

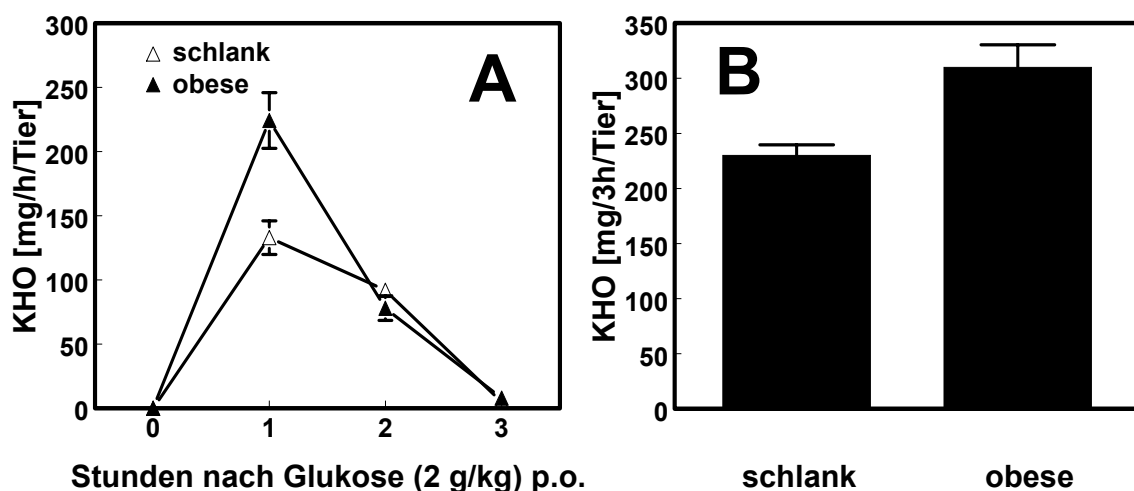


Abb. III-45 Verlauf der berechneten Netto-KHO (A), sowie die Netto-KHO über den Zeitraum von 3 Stunden (B) nach der oralen Glukosebelastung bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=7-8$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

III.3.3 oGTT intraindividuell - Renaler Glukoseverlust

In dieser Studie wurde die über die Nieren ausgeschiedene Glukosemenge untersucht.

Im Gegensatz zu den 8 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten lag die Blutglukose bei den diabetischen Tieren nach Glukosegabe über der Nierenschwelle und führte zu einer Glukosurie (Tabelle III-12).

Tabelle III-14 Harnvolumen und Harnglukose, gemessen 6 Stunden nach Beginn des oGTT bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8.

Gruppe	Harnvolumen [ml]		Harnglukose [mg]	
	Kontrolle	Glukose	Kontrolle	Glukose
schlank	1,5 \pm 0,2	1,7 \pm 0,3	0,3 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0
obese	2,4 \pm 0,4	2,9 \pm 0,3	4,2 \pm 2,6	23,4 \pm 1,6

Um in der Schlussrechnung den Anteil des renalen Glukoseverlustes bilanzieren zu können, wurde die Netto-Glukoseausscheidung berechnet (Tabelle III-13). Während bei den schlanken Ratten kein Glukoseverlust auftrat, verloren die obesen Tiere 19 mg Glukose über die Nieren.

Tabelle III-15 Menge des renalen Verlustes an Glukose, 6 Stunden nach Glukosebelastung bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, n=8.

Gruppe	Harn-Glukose [mg]
schlank	0
obese	19

III.3.4 oGTT interindividuell

Das für die interindividuelle oGTT Studie verwendete Kollektiv ist in Tabelle III-14 aufgeführt. Um einen direkten Vergleich mit einer Stoffwechsellage bei gefütterten Bedingungen zu erlauben, wurde die Versuchsgruppe um eine zusätzliche Kontrolle (Nahrung ad libitum) erweitert.

Tabelle III-16 Körpermasse und applizierte Glukosemenge der jeweiligen Satellitengruppe in der interindividuellen oGTT-Studie. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8.

Zeitfenster/ Gruppe	Körpermasse [g]		Applizierte Glukose [mg]	
	schlank	obese	schlank	obese
0 min	326 \pm 5	338 \pm 10		
30 min	311 \pm 9	339 \pm 20	623 \pm 17	678 \pm 40
60 min	342 \pm 4	330 \pm 17	683 \pm 9	661 \pm 34
120 min	326 \pm 7	324 \pm 12	652 \pm 15	648 \pm 25
180 min	324 \pm 6	337 \pm 9	648 \pm 12	674 \pm 18
Kontrolle (gefüttert)	347 \pm 9	350 \pm 8		

III.3.4.1 Metabolische Parameter

Um die durch den oGTT verursachten Stoffwechseländerungen aufzuzeigen, wurden verschiedene Serumparameter (III.3.4.1.a) bestimmt.

III.3.4.1.a Blut/Serum

Nach Glukosegabe stieg die Blutglukose (Abb. III-46, A) bei den schlanken Ratten mit einem Nüchtern-Wert von 5,0 mmol/l auf einen Wert von 9,4 mmol/l binnen 30 Minuten an und fiel dann bis Versuchsende (6,9 mmol/l) wieder leicht ab. Die obesen ZDF-Ratten hatten eine signifikant höhere Nüchtern-Blutglukose von 13,8 mmol/l und zeigten nach Glukosegabe einen stärkeren Anstieg mit einem Maximum von 23,0 mmol/l. Bei den gefütterten Gruppen lagen die Werte der Blutglukose der obesen Tiere (24,3 mmol/l) signifikant höher als bei der schlanken Gruppe (7,7 mmol/l). Insulin (Abb. III-46, B) verlief im Falle der schlanken Ratten analog der Blutglukose; nach Glukosegabe stieg der Wert von 0,9 ng/ml auf ein Maximum von 1,7 ng/ml (t=30 min) und lag zu Versuchsende bei 1,3 ng/ml. Die obesen Tiere hatten gefüttert einen Insulinspiegel von 3,2 ng/ml (schlank: 1,6 ng/ml) und zeigten erst gegen Ende des Versuchs einen signifikanten Anstieg auf 3,3 ng/ml.

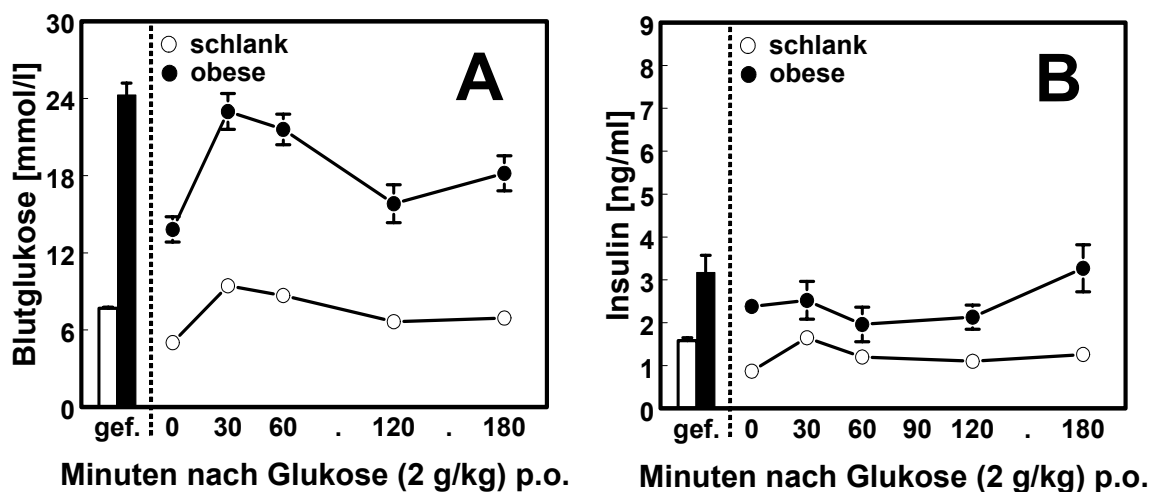


Abb. III-46 Blutglukose (A) und Insulinspiegel (B) bei den 16 Wochen alten, gefütterten und gehungerten (mit Glukosebelastung) ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Während bei den 8 Wochen alten, obesen Tieren die Hyperinsulinämie (Abb. III-19, B) eine Hyperglykämie nach nächtlicher Nahrungskarenz zu kompensieren vermochte, zeigten die 16 Wochen alten, diabetischen Tiere eine ausgeprägte Nüchtern-Hyperglykämie mit einem steilen Anstieg der Blutglukose (Abb. III-46, A) als Folge der relativen Insulindefizienz (Abb. III-46, B).

Bei den schlanken Tieren verlief Laktat (Abb. III-47) in ähnlicher Weise wie die Blutglukose: die Werte erhöhten sich von 1,1 mmol/l mäßig auf 1,5 mmol/l und lagen am Ende des Versuchs bei 1,2 mmol/l. Bei der obesen Gruppe zeigte sich unmittelbar nach Glukosegabe ein markanter Anstieg von 1,8 mmol/l auf 5,0 mmol/l mit einem darauffolgenden, kontinuierlichen Abfall auf 2,7 mmol/l zu Ende des oGTT. Unter gefütterten Bedingungen betrug der Wert für Laktat 1,6 mmol/l (schlank) bzw. 2,7 mmol/l (obese).

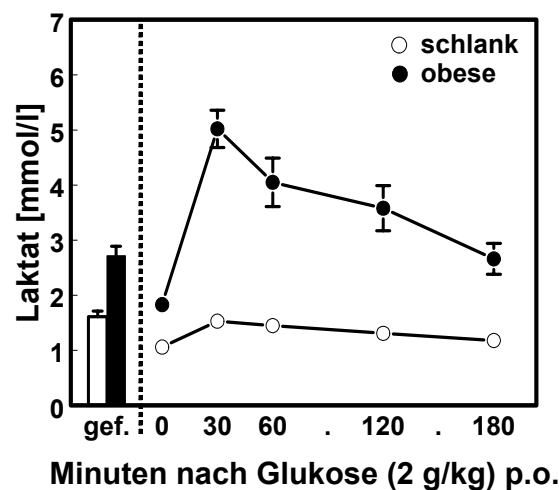


Abb. III-47 Verlauf von Laktat während des oGTT, vergleichend mit dem Laktat-spiegel unter gefütterten Bedingungen bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Die Spiegel der FFS (Abb. III-48, A) waren sowohl unter gefütterten Bedingungen (schlank: 0,35 mmol/l, obese 0,42 mmol/l) als auch während des oGTT bei beiden Gruppen auf ähnlichem Niveau. Die FFS fielen zeitgleich nach Glukosegabe von 1,07 mmol/l (schlank) bzw. 0,83 mmol/l (obese) auf 0,35 mmol/l (schlank) bzw. 0,38 (obese) zur 30. Minute ab und stiegen bis Versuchsende wieder

auf Werte unter Ausgangsniveau an. Die TG (Abb. III-48, B) von schlanken und obesen Tieren unterscheiden sich signifikant voneinander: 0,9 mmol/l (schlank, gef.) vs. 4,2 mmol/l (obese, gef.). Bei der schlanken Versuchsgruppe war im Verlauf der TG-Spiegel keine Dynamik zu erkennen (Werte: $\pm 0,3$ mmol/l). Bei den obesen ZDF-Ratten fielen die Werte zur 60. Minute ab (3,6 mmol/l) und lagen zum Versuchsende mit 6,7 mmol/l über dem Nüchtern-Wert von 5,6 mmol/l.

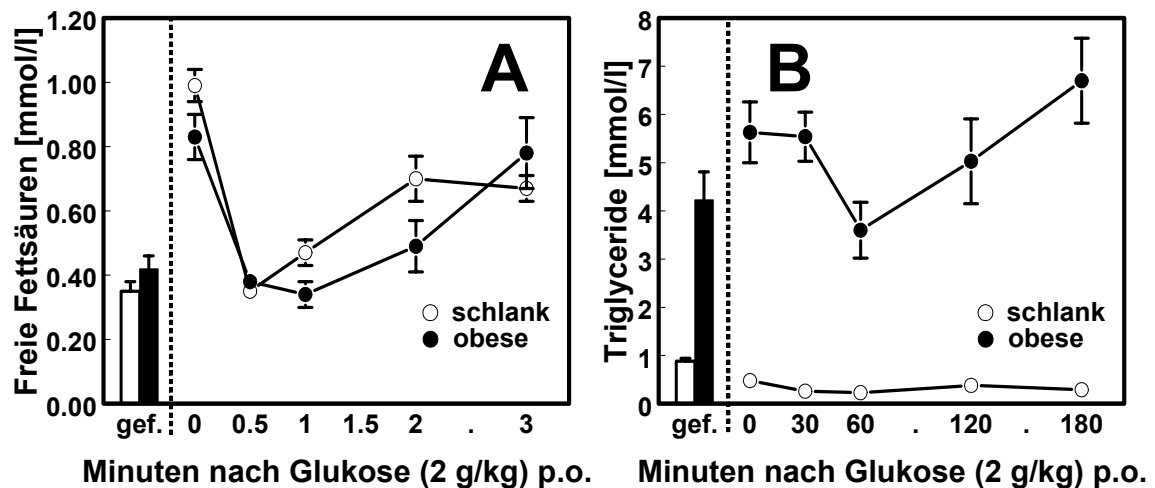


Abb. III-48 Verlauf von freien Fettsäuren (A) und Triglyceriden (B) während des oGTT, vergleichend mit den Werten unter gefütterten Bedingungen bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Die Ketonkörperwerte (Abb. III-49) der gefütterten Tiere lagen bei 166 μ mol/l (schlank) bzw. bei 328 μ mol/l (obese). Eine halbe Stunde nach Glukosebelastung zeigte sich bei den schlanken ZDF-Ratten ein abrupter Abfall von 1617 μ mol/l auf 243 μ mol/l, danach erhöhten sich die Werte bis zum Ende des oGTT auf 907 μ mol/l. Bei den obesen Tieren war ein ähnlicher Verlauf zu erkennen, jedoch auf einem tieferen Niveau. Von 572 μ mol/l zu Versuchsbeginn sanken die Werte binnen 30 Minuten auf 243 μ mol/l und erreichten beim letzten Messpunkt 376 μ mol/l.

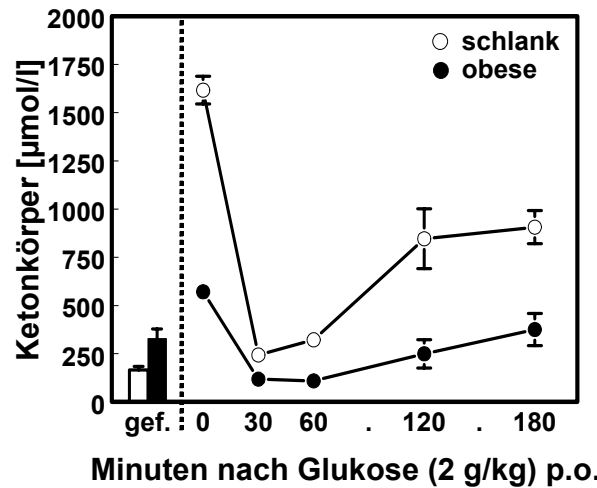


Abb. III-49 Verlauf von Ketonkörpern während des oGTT, vergleichend mit den Werten unter gefütterten Bedingungen bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Unter gefütterten Bedingungen lag das Cholesterin (Abb. III-50) der obesen Tiere mit 4,3 mmol/l signifikant höher als das der schlanken Tiere mit 2,4 mmol/l. Die Werte änderten sich weder nach dem Fasten noch nach der Glukosebelastung merklich.

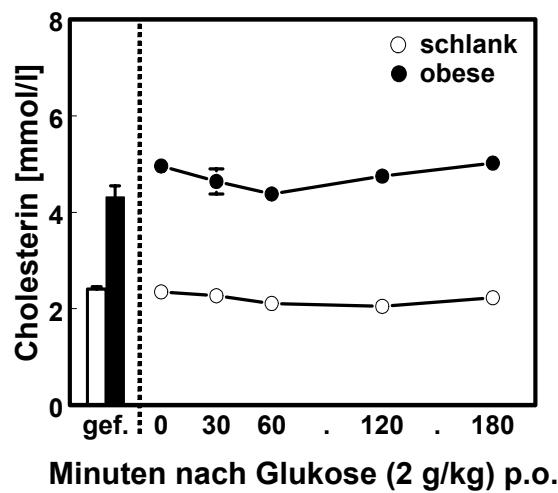


Abb. III-50 Verlauf von Cholesterin während des oGTT, vergleichend mit dem Cholesterinspiegel unter gefütterten Bedingungen bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

III.3.4.1.b Organparameter

Um den Anteil der gespeicherten Glukose zu quantifizieren, wurde während des oGTT freie Glukose, Leber- und Muskelglykogen bestimmt. Desweiteren sollen die Bestimmungen von G6P, F6P und ATP in Leber (hier zusätzlich TG) und Muskel die Stoffwechselveränderungen in den beiden Organen aufzeigen.

Der Glykogengehalt (Abb. III-51, A) der obesen Tiere war gefüttert mit 52,1 mg/g Leber ca. doppelt so hoch wie der der schlanken Ratten, deren Leber-Glykogenspeicher nach 18 h Fasten nahezu leer waren (0,1 mg/g) und bis zum Versuchsende 4,0 mg Glykogen pro g Leber einlagerten. Die obesen Tiere speicherten bis zum Ende des oGTT 4,4 mg Glykogen pro g Leber. Auch der Gehalt an freier Glukose (Abb. III-51, B) lag bei den obesen Tieren zu jedem Zeitpunkt über dem der schlanken ZDF-Ratten. Während die freie Glukose bei den schlanken Tieren von 1,0 auf 3,0 mg/g Leber stieg, erhöhte sie sich bei den obesen Tieren nur wesentlich in den ersten 30 Minuten von 3,4 auf 5,0 mg/g Leber und fiel gegen Ende wieder auf 3,9 mg/g Leber ab.

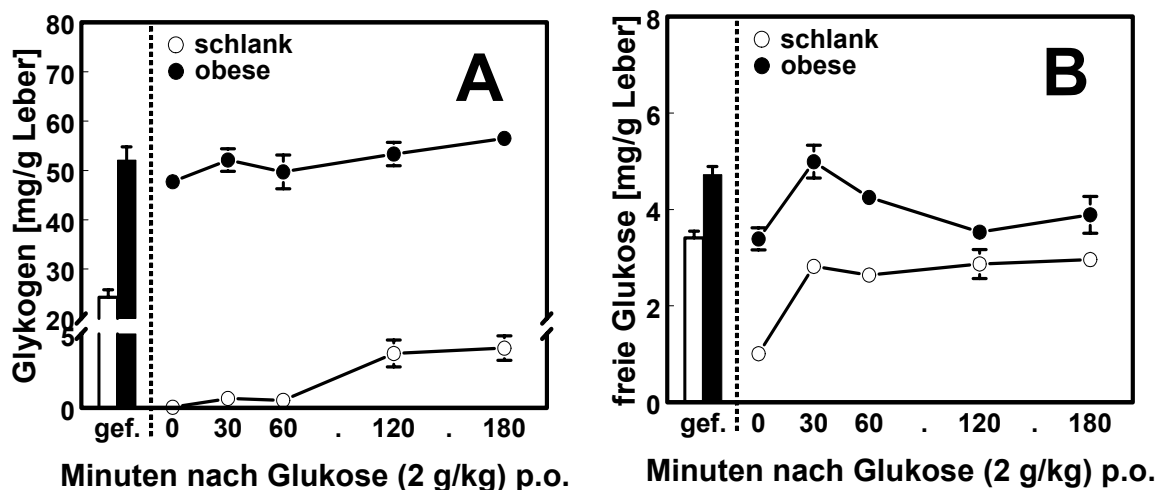


Abb. III-51 Spiegel von Leberglykogen (A) und freier Glukose (B) in der Leber (pro Gramm Feuchtgewicht) während des oGTT, vergleichend mit dem Gehalt unter gefütterten Bedingungen, bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Ausgehend von der Lebermasse (Tabelle III-15) wurde der Gesamtfluss an Glukoseäquivalenten berechnet.

Tabelle III-17 Lebermasse und geschätzte Skelettmuskelmasse der jeweiligen Satellitengruppe in der interindividuellen oGTT-Studie. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8.

Zeitfenster	Lebermasse [g]		Skelettmuskelmasse [g]	
	schlank	obese	schlank	obese
0 min	7,9 \pm 0,2	12,8 \pm 0,3	163 \pm 2	118 \pm 3
30 min	7,5 \pm 0,2	13,7 \pm 0,4	156 \pm 4	119 \pm 7
60 min	8,2 \pm 0,2	13,2 \pm 0,6	171 \pm 2	116 \pm 6
120 min	8,3 \pm 0,2	13,8 \pm 0,6	163 \pm 4	113 \pm 4
180 min	7,8 \pm 0,2	13,7 \pm 0,7	162 \pm 3	118 \pm 3

Die Skelettmuskelmasse wurde auf 50% (schlank) bzw. auf 35% (obese) der Körpermasse der Versuchstiere geschätzt (Even et al., 2001).

Das Leberglykogen (Abb. III-52, A) erhöhte sich bei den schlanken ZDF-Ratten von 0,4 mg (t=0 min) auf 31,8 mg (t=180 min). Bei den obesen Tieren nahm die Glykogenmenge von 611 mg bis zum letzten Messwert um weitere 164 mg zu. Bis zum Ende des oGTT betrug der Gehalt an freier Glukose (Abb. III-52, B) in der Leber der schlanken ZDF-Ratten 23,0 mg im Vergleich zum Anfangswert (8,0 mg), bei den obesen Tieren erfolgte während des oGTT ein Anstieg von 43,3 mg auf 53,4 mg.

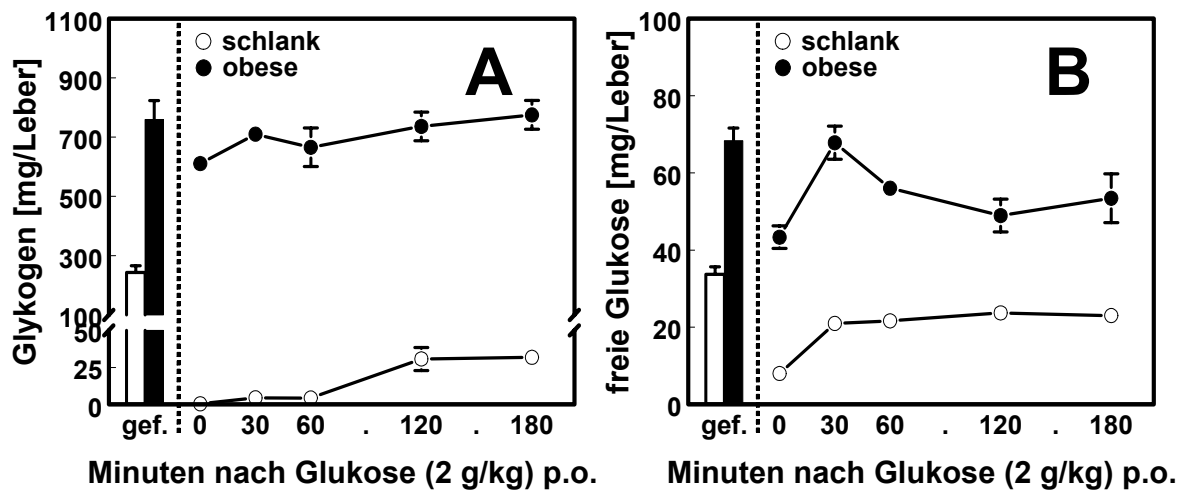


Abb. III-52 Spiegel von Leberglykogen (**A**) und freier Glukose (**B**) in der Leber während des oGTT, vergleichend mit dem Gehalt unter gefütterten Bedingungen bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Das Muskelglykogen (Abb. III-53) betrug bei den gefütterten Tieren 3,1 mg/g (schlank) bzw. 3,7 mg/g (obese). Nach Glukosegabe erhöhte sich der Wert während der Zeitspanne von 3 Stunden bei den schlanken ZDF-Ratten von 2,2 mg/g auf 2,8 mg/g und bei der obesen Gruppe von 3,8 auf 4,0 mg/g.

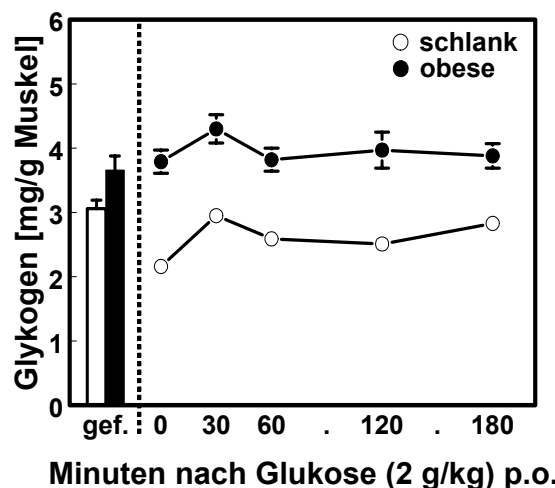


Abb. III-53 Spiegel von Muskelglykogen während des oGTT, vergleichend mit dem Gehalt unter gefütterten Bedingungen bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Ausgehend von der geschätzten Skelettmuskelmasse (Tabelle III-15) wurde auch für dieses Kompartiment der Gesamtfluss an Glukoseäquivalenten (Abb. III-54) berechnet.

Der Glykogengehalt der Skelettmuskelmasse erhöhte sich zwischen der ersten und letzten Messung um 106 mg (schlank) bzw. um 11 mg (obese).

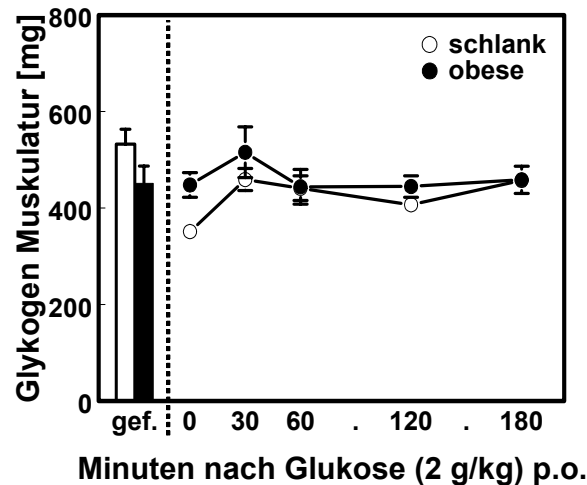


Abb. III-54 Geschätzter Glykogengehalt der Skelettmuskulatur während des oGTT, sowie Werte unter gefütterten Bedingungen bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Für die zusammenfassende Bilanzierung (III.3.4.2) wurde der Netto-Glukosefluss (Tabelle III-16) bis zum Versuchsende in die o.g. Kompartimente berechnet.

Tabelle III-18 Netto-Glukosefluss in Leber und Muskel bis zum Ende des oGTT bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese.

Netto-Glukosefluss	schlank	obese
Freie Glukose, Leber [mg]	15	10
Glykogen, Leber [mg]	31	164
Glykogen, Muskel [mg]	106	11

Unter Fütterung waren G6P (Abb. III-55, A) und F6P (Abb. III-55, B) in der schlanken Gruppe höher als im obesen Kollektiv (G6P: schlank: 438 nmol/g, obese: 312 nmol/g; F6P: schlank: 81 nmol/g, obese: 65 nmol/g). Anders jedoch nach Nahrungskarenz; während bei den obesen Tieren die beiden Metabolite kaum abnahmen (G6P: 252 nmol/g, F6P: 55 nmol/g), fielen bei den schlanken Tieren die Spiegel bis zur Nachweisgrenze (G6P: 41 nmol/g, F6P bei t=0, 30 min unter der Nachweisgrenze) ab. Während des oGTT lag die Menge an G6P und F6P in der Leber der obesen Tiere stets über den Werten der schlanken Ratten. Gemeinsam war den beiden Gruppen ein Anstieg der beiden Parameter nach Glukoseapplikation. Bei obesen Tieren verlief dieser eher mäßig, wobei die Endwerte im Bereich der Werte unter gefütterten Bedingungen lagen.

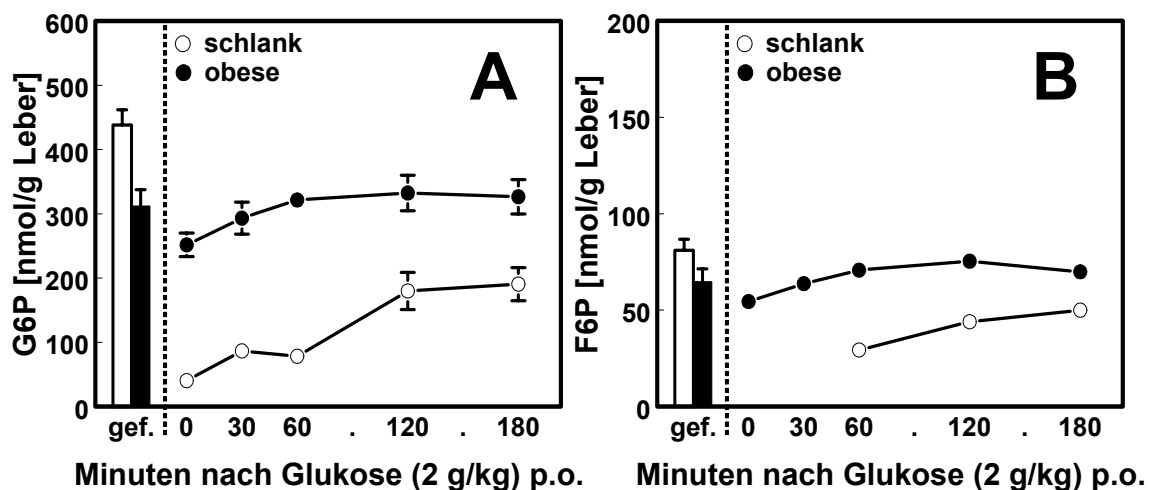


Abb. III-55 Spiegel von G6P (A) und F6P (B) in der Leber während des oGTT, vergleichend mit dem Gehalt unter gefütterten Bedingungen bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=8, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Im Muskel war bei beiden Gruppen der Verlauf von G6P (Abb. III-56, A) analog dem von F6P (Abb. III-56, B). Beide Parameter erhöhten sich jeweils nach Glukosegabe und erreichten bis Versuchsende Werte, die knapp unter (schlank) bzw. über (obese) denen bei Fütterung lagen. Während der Zeitspanne von drei Stunden erhöhte sich G6P von 1483 nmol/g (schlank) bzw. 2389 nmol/g (obese) auf 1702 nmol/g (schlank) bzw. 2590 nmol/g (obese). F6P stieg bei der schlanken Gruppe von 303 nmol/g auf 366 nmol/g und bei den obesen Tieren von 532 nmol/g auf 566 nmol/g.

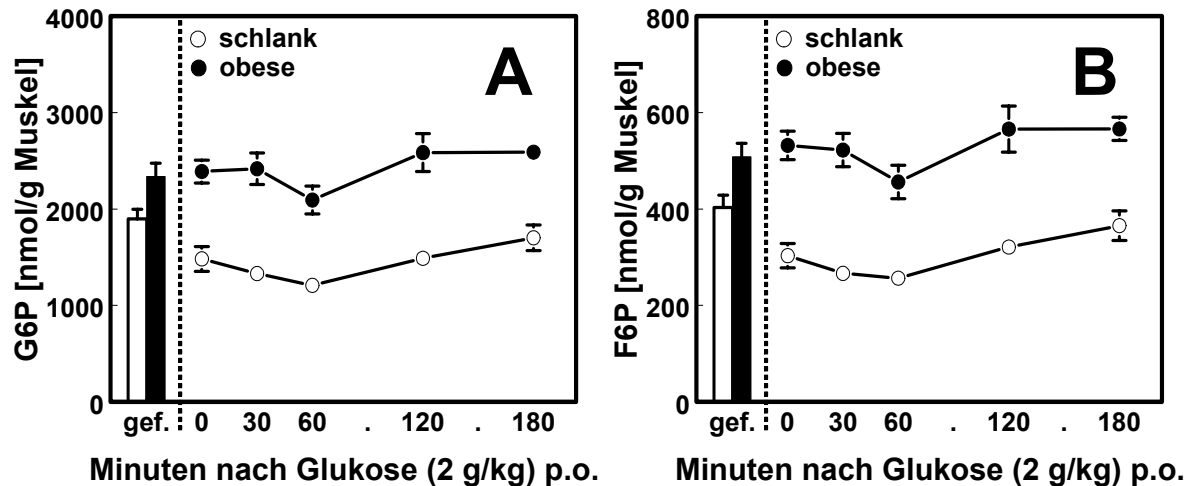


Abb. III-56 Spiegel von G6P (A) und F6P (B) in der Muskulatur während des oGTT, sowie Werte unter gefütterten Bedingungen bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Der ATP-Gehalt in der Leber (Abb.III-57) stieg nach Glukosebelastung bei der schlanken Gruppe kurzfristig von 115 nmol/g auf 187 nmol/g an und fiel zu Versuchsende wieder auf 138 nmol/g ab. Bei der obesen Versuchsgruppe sanken die Werte von 123 nmol/g auf 108 nmol/g bis zur dritten Stunde.

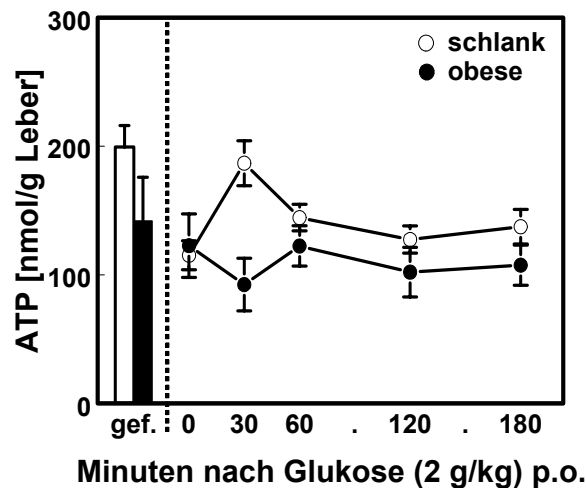


Abb. III-57 ATP-Menge in der Leber während des oGTT, vergleichend mit den Werten unter gefütterten Bedingungen bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$, gef.: gefüttert.

In der schlanken Gruppe kam es nach Glukosegabe zu einem signifikanten Anstieg der Muskel-ATP-Spiegel (Abb. III-58) von 2499 nmol/g auf Werte (2922 nmol/g), die über denen bei gefütterten Bedingungen (2673 nmol/g) lagen. Im

obesen Kollektiv jedoch war weder nach dem Nahrungsentzug (2296 nmol/g) noch nach Applikation eine Dynamik zu erkennen (2316 nmol/g; $t = 180$ min).

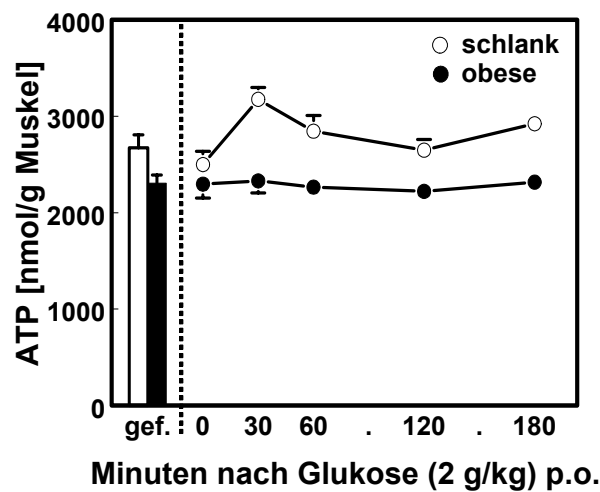


Abb. III-58 ATP-Menge im Muskel während des oGTT, vergleichend mit den Werten unter gefütterten Bedingungen bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Die Leber-TG (Abb. III-59) der obesen Tiere waren gefüttert (22,0 mg/g) ca. dreimal so hoch wie die der schlanken Ratten (7,5 mg/g). Nach der Nahrungskarenz lagen die Werte (15,9 mg/g: schlank; 28,0 mg/g: obese) in beiden Gruppen jeweils über den Werten bei gefütterten Bedingungen. Bei dem schlanken Kollektiv zeigte sich ein Abfall der TG nach Glukosegabe (9,1 mg/g: $t=180$ min), während bei den obesen Tieren keine Dynamik zu erkennen war (24,5 mg/g: $t=180$ min).

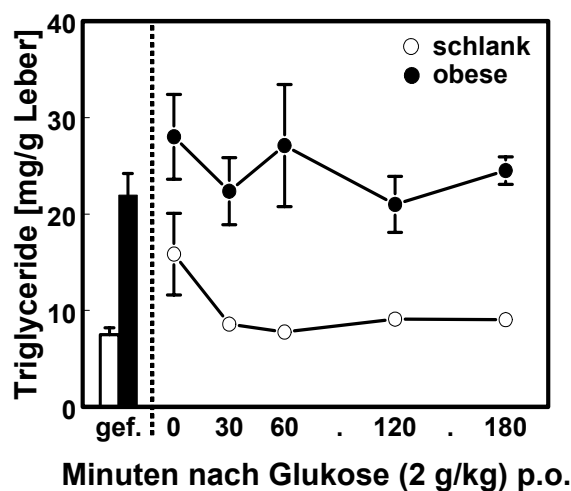


Abb. III-59 Triglyceridspiegel in der Leber während des oGTT, vergleichend mit den Werten unter gefütterten Bedingungen bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$, gef.: gefüttert (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

III.3.4.2 Bilanzierung

Bei der Bilanzierung wurde berechnet, wie viel der applizierten Glukosemenge letztendlich oxidiert, über den nicht-oxidativen Stoffwechselweg in Leber und Muskel gespeichert bzw. über die Nieren ausgeschieden wurde. Die Netto-KHO, der Netto-Harnglukoseverlust und der Netto-Glukosefluss in die Kompartimente Leber und Muskel wurden ins Verhältnis zu der applizierten Glukosemenge (Tabelle III-11, 14) gesetzt. Die Anteile wurden in der jeweiligen Tortengraphik (Abb. III-60, 61) als Prozentwerte angegeben.

schlanke ZDF-Ratten

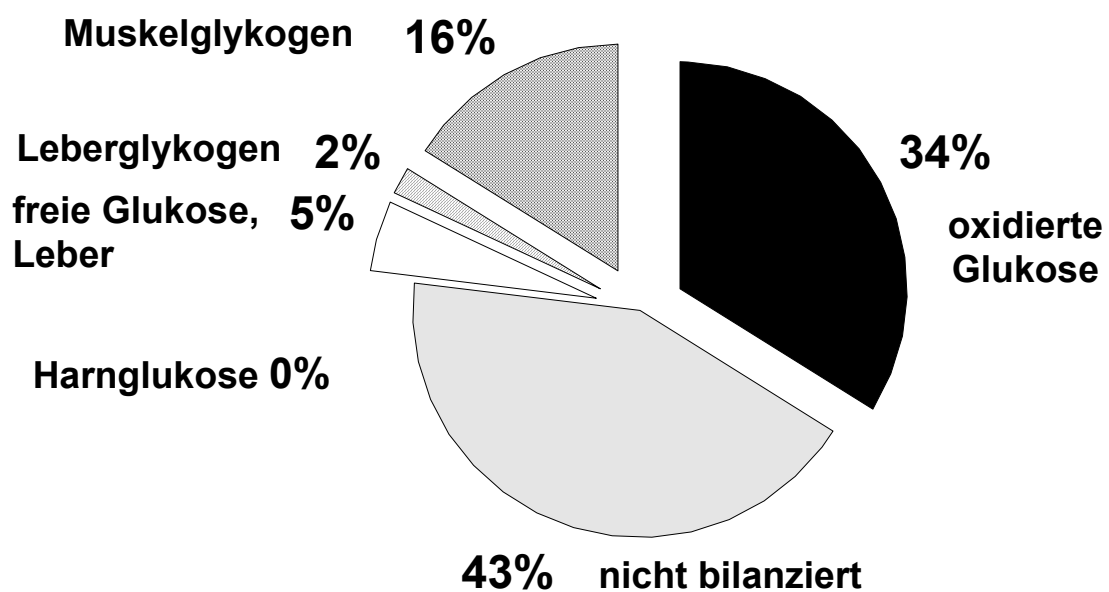


Abb. III-60 Prozentuale Anteile oxidiierter Glukose, Muskelglykogen, Leberglykogen, freier Glukose (Leber) und Harnglukose an der applizierten Glukosemenge bei den 16 Wochen alten, schlanken ZDF-Ratten.

obese ZDF-Ratten

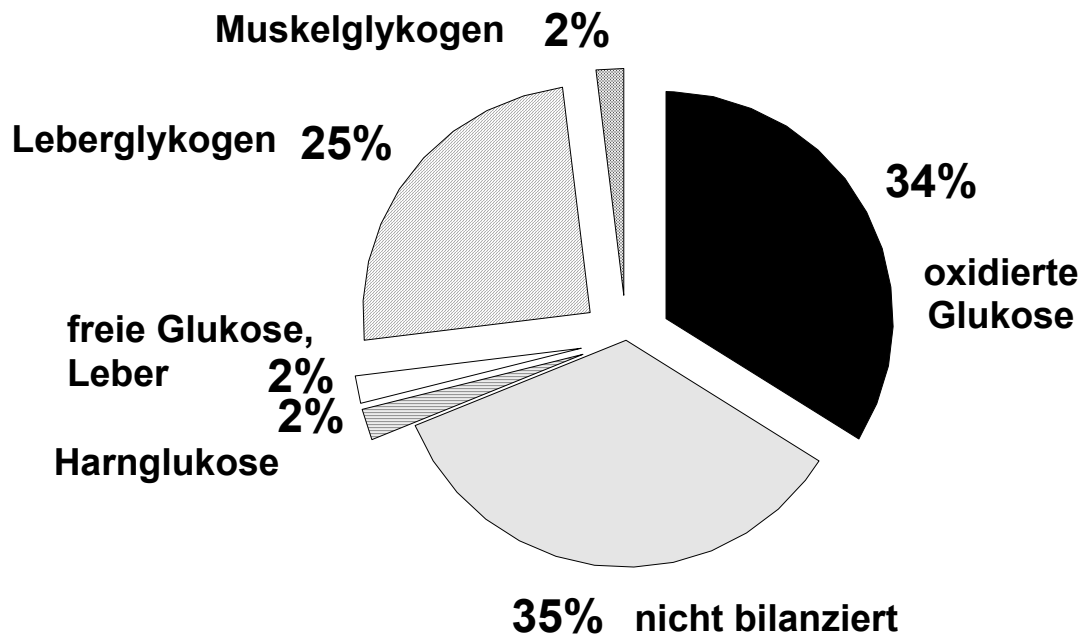


Abb. III-61 Prozentuale Anteile oxidierter Glukose, Muskelglykogen, Leberglykogen, freier Glukose (Leber) und Harnglukose an der applizierten Glukosemenge bei den 16 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten.

Die Menge an oxidierter Glukose lag mit 34% bei schlanken bzw. 35% bei obesen Tieren höher als der in Leber und Muskel gespeicherte Anteil. Die prozentualen Anteile für Leber- und Muskelglykogen unterschieden sich zwischen schlank und obese signifikant. Die schlanken Tiere speicherten von der applizierten Glukosemenge 16% als Muskelglykogen, nur 2% in Form von Leberglykogen und 5% als freie Glukose. Bei den obesen Tieren flossen dagegen 25% der applizierten Glukose in Leberglykogen und nur je 2% in Muskelglykogen und freie Glukose. Bei den obesen ZDF-Ratten trat ein zusätzlicher renaler Glukoseverlust von 2% auf. In der Bilanzierung konnten 43% (schlank) bzw. 35% (obese) der applizierten Glukose nicht erfasst werden.

Die Tabelle III-19 zeigt zusätzlich eine Gegenüberstellung der Bilanzierung für schlanke und obese ZDF-Ratten.

Tabelle III-19 Prozentuale Anteile oxidierter Glukose, Muskelglykogen, Leberglykogen, freier Glukose (Leber) und Harnglukose an der applizierten Glukosemenge bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten (oGTT: intra-individuell, interindividuell; schlank vs. obese).

	schlank				obese			
			Glukose pro Kompartiment				Glukose pro Kompartiment	
	KGW (g)	appl. Glukose (mg)	absolut (mg)	relativ (%)	KGW (g)	appl. Glukose (mg)	absolut (mg)	relativ (%)
intra-individuell	334	668			445	891		
KHO			230	34			310	34
Harnglukose			0	0			19	2
inter-individuell	311-342	623-683			324-339	562-576		
Muskelglykogen			100-109	16			11-12	2
Leberglykogen			13-13	2			140-145	25
Leber: freie Glukose			31-34	5			11-12	2
nicht-bilanziert			268-293	43			197-202	35

III.3.4.3 Biochemische Parameter

Auch bei dem 16 Wochen alten Tierkollektiv wurde die PDH-Aktivität und die PDK4 Expression im Grundzustand (gefüttert vs. gehungert bzw. schlank vs. obese) und während des oGTT untersucht.

III.3.4.3.a PDH-Aktivität

Die Enzymaktivität (siehe Kapitel III.2.2.a) im Lebergewebe (Abb. III-62, A) bei obesen und schlanken Tieren war unter gefütterten Bedingungen mit 1 mU/mg identisch. In der Muskulatur (Abb. III-62, A) lagen die PDH-Aktivitätswerte bei gefütterten, schlanken und obesen Tieren um einen Faktor 2 höher als nach Nahrungskarenz. Die Aktivität betrug gefüttert bei schlanken Tieren 8,4 mU/mg bzw. 6,6 mU/mg (obese) und gehungert 4,0 mU/mg bzw. 3,2 mU/mg (obese).

Zusätzlich wurde die Gesamtaktivität (Abb. III-62, B) durch Zugabe von λ -PPase (siehe Kapitel II.2.2.a) bestimmt.

Hier zeigte sich, dass die „totale Aktivität“ der PDH obeser Tiere sowohl im Lebergewebe als auch in der Muskulatur im Vergleich zu den schlanken Tieren signifikant erhöht war.

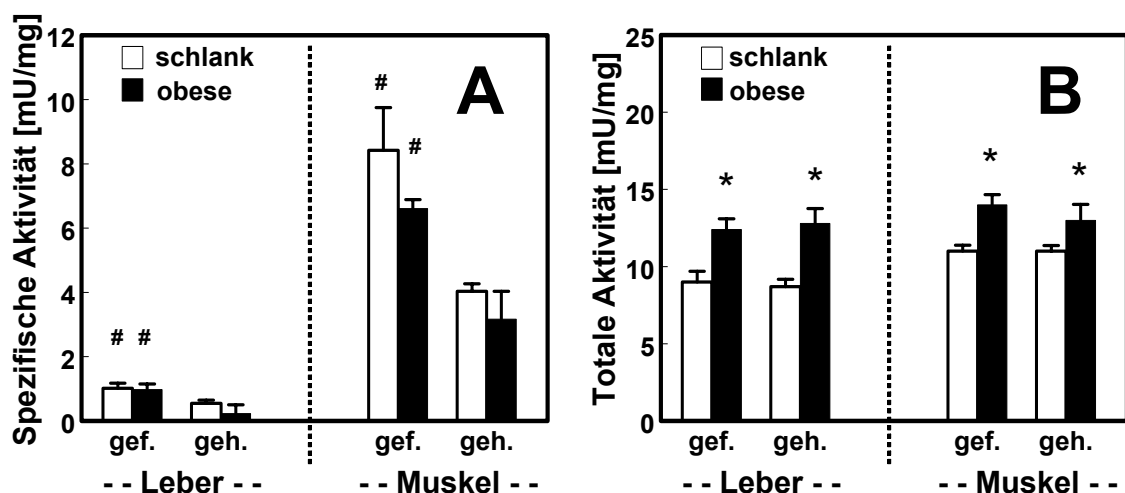


Abb. III-62 PDH-Aktivität unter gefütterten und gehungerten Bedingungen (A), sowie nach vollständiger Aktivierung (B) bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten in Leber und Muskulatur, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$, # $P < 0,05$ vs. gehungert, * $P < 0,05$ vs. schlank; gef.: gefüttert, geh.: gehungert. Die Aktivität wurde wie unter II.2.2.a beschrieben bestimmt.

Mit Hilfe der Gesamtaktivität ließ sich der prozentuale Anteil aktiver PDH (Abb. III-63) berechnen.

Es zeigte sich, dass der Anteil aktiver PDH bei den schlanken ZDF-Ratten signifikant höher lag als bei den obesen Ratten, während bei Betrachtung der spezifischen Aktivität (Abb. III-62, A) der Unterschied zwischen den beiden Gruppen kaum zu sehen war.

In der Leber war unter Fütterung die PDH lediglich zu 16% (schlank) bzw. 10% (obese) aktiv, wohingegen die Anteile im Muskel bei 73% (schlank) bzw. 44% (obese) lagen.

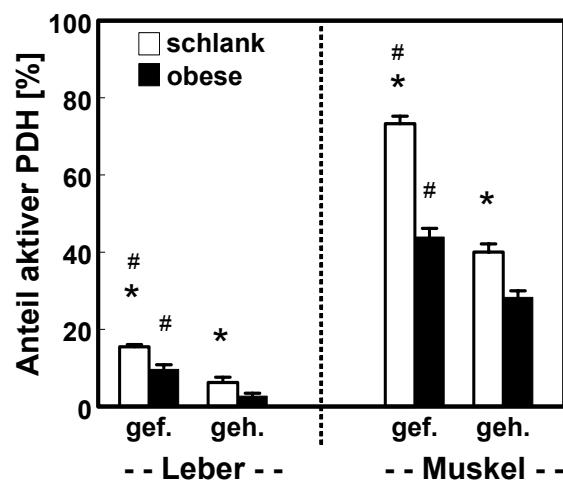


Abb. III-63 Prozentualer Anteil aktiver PDH unter Fütterung und nach Nahrungskarenz in Leber und Muskelgewebe bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$, $*P < 0,05$ vs. obese, $\#P < 0,05$ vs. gehungert; gef.: gefüttert, geh.: gehungert. Die Aktivität wurde wie unter II.2.2.a beschrieben bestimmt.

Um die Änderungen der Aktivität des PDH-Komplexes nach Glukosebelastung aufzuzeigen, wurden auch bei diesem oGTT für die Zeitfenster: 0 min, 60 min und 180 min die Enzymaktivitäten bestimmt (Abb. III-64).

Nach Glukosegabe stieg und fiel die Aktivität der Leber-PDH (Abb. III-64, A) in beiden Gruppen synchron. Die Werte erhöhten sich von 0,6 mU/mg (obese: 0,3 mU/mg) auf 2,2 mU/mg (obese: 1,4 mU/mg) und sanken bis Versuchsende bei beiden Gruppen auf 1,4 mU/mg.

Analog dazu verlief auch die PDH-Aktivität im Muskel (Abb. III-64, B), insgesamt jedoch auf einem signifikant höheren Niveau. Nach Gabe der Glukoselösung wurde das Maximum der Aktivität (14,4 mU/mg: schlank; 10,0 mU/mg: obese) wiederum nach 60 Minuten erreicht.

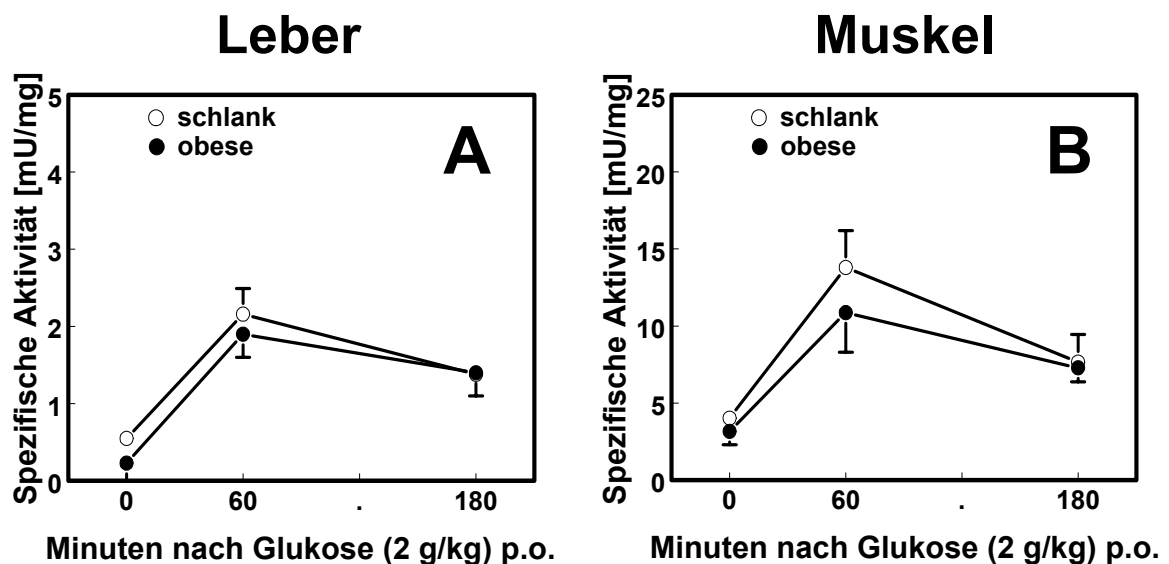


Abb. III-64 PDH-Aktivität während des oGTT bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten in Leber (A) und Muskulatur (B); schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$ (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole). Die Aktivität wurde wie unter II.2.2.a beschrieben bestimmt.

III.3.4.3.b PDK4 - Proteinmenge

Um die Regulation des gesamten Enzymkomplexes nach Glukosebelastung zu verstehen, wurde auch die PDK4-Proteinmenge (Abb. III-65) bestimmt.

Im Muskel, in dem signifikant weniger PDK4 exprimiert war als in der Leber, verdoppelte sich in beiden Gruppen (schlank, obese) die Enzymmenge nach der Hungerphase. Unter gefütterten Bedingungen differierte die Proteinmenge in der Leber sichtlich zwischen schlanken und obesen Tieren (Faktor 1,6). Bei den schlanken Tieren erhöhte sich nach dem Hungern die PDK4 Menge in der Leber um 70%, bei den obesen ZDF-Ratten war trotz des Nahrungsentzugs keine weitere Regulation mehr erkennbar.

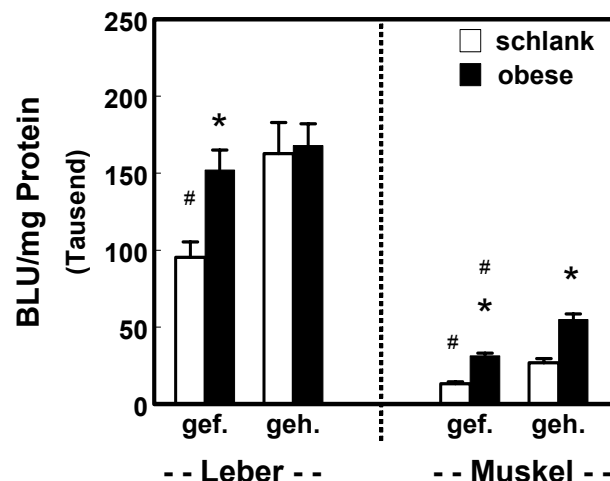


Abb. III-65 PDK4-Proteinmenge unter Fütterung und bei Nahrungskarenz in Leber und Muskelgewebe bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$, $*P < 0,05$ vs. schlank, $\#P < 0,05$ vs. gehungert; gef.: gefüttert, geh.: gehungert. Die Proteinmenge wurde durch Western-Blot-Analyse bestimmt (s. Kap. II.2.3.c/d).

Bei den schlanken ZDF-Ratten nahm die Proteinmenge in beiden Geweben nach Glukosegabe im Vergleich zu dem Ausgangswert signifikant ab, wobei im untersuchten Muskel (Abb. III-66, B) dieser Tiere die PDK4 sogar ab dem Zeitpunkt $t=60$ min kaum mehr zu detektieren war. Bei den obesen Versuchstieren zeigte sich im Lebergewebe (Abb. III-66, A) keine Änderung der Enzymmenge nach Glukosegabe, während im Muskel eine signifikante Abnahme zu erkennen war ($t=120$ min).

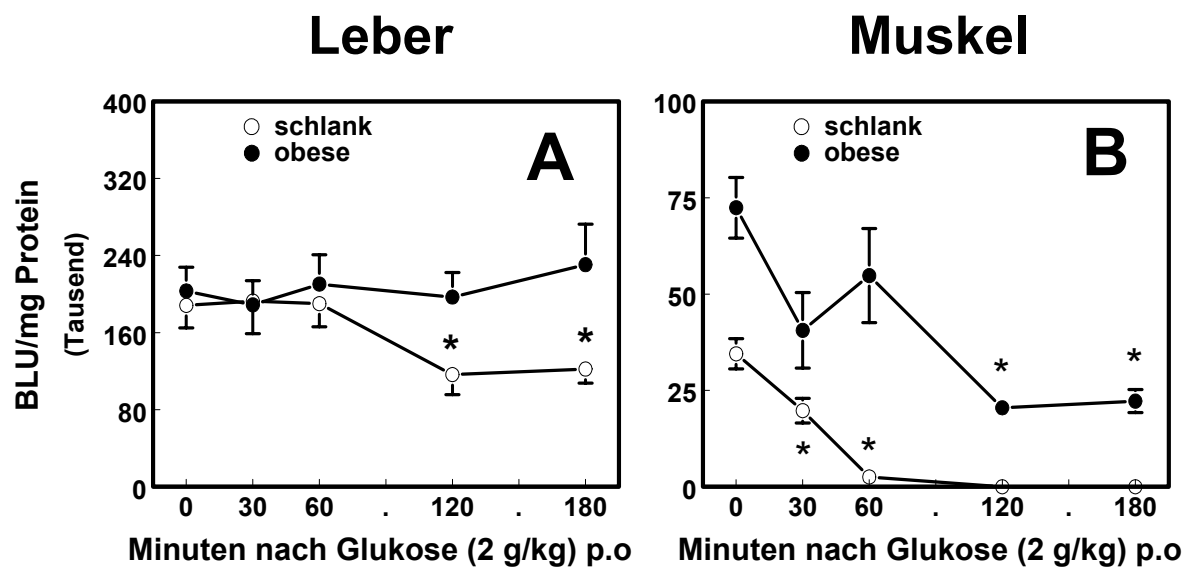


Abb. III-66 PDK4-Proteinmenge während des oGTT in Leber- (A) und Muskelgewebe (B) bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$, $*P < 0,05$ vs. $t=0$ min. Die Proteinmenge wurde durch Western-Blot-Analyse bestimmt (s. Kap. II.2.3.c/d).

III.3.4.3.c PDK2 - Proteinmenge

Ergänzend zur Regulation des PDH-Komplexes wurden die Gewebe zusätzlich hinsichtlich der PDK2 Proteinmenge (Abb. III-67) untersucht.

Die PDK2 Proteinmenge war ebenfalls in der Leber in stärkerem Maße als im Muskel exprimiert. In beiden Organen war die Proteinmenge im gehungerten Zustand signifikant erhöht. Eine Ausnahme stellte der Muskel bei den schlanken Kontrolltieren dar. Der Vergleich von PDK2 und PDK4 zeigte, dass beide organspezifisch in gleicher Weise reguliert wurden.

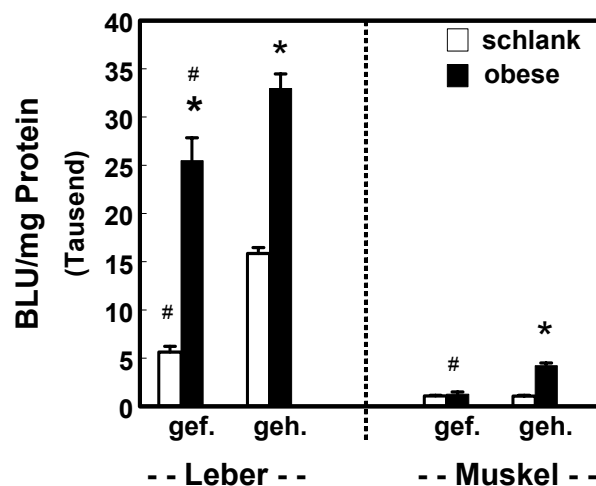


Abb. III-67 PDK2 Proteinmenge unter Fütterung und bei Nahrungskarenz in Leber- und Muskelgewebe bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten, schlank vs. obese. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$, $*P < 0,05$ vs. schlank, $\#P < 0,05$ vs. gehungert; gef.: gefüttert, geh.: gehungert. Die Proteinmenge wurde durch Western-Blot-Analyse bestimmt (s. Kap. II.2.3.c/d).

III.3.4.3.d PDH E1 α/β - Proteinmenge

Von den gefütterten Tieren wurde jeweils auch die PDH-E1 (Abb. III-68) untersucht, um festzustellen, ob der Enzymkomplex selbst, in Abhängigkeit von der Stoffwechselsituation (schlank vs. obese), reguliert wurde.

Die Expression von E1 alpha und beta war in den Geweben der obesen Tiere stets höher (Faktor 2 bis 2,8) als in denen der schlanken Vergleichstiere. Die Proteinmenge in Leber- und Muskelgewebe war im Falle des schlanken Kollektivs gleich hoch, während die Leber-PDH-E1 innerhalb der obesen Versuchsgruppe bei beiden Untereinheiten auf einem höheren Niveau lag im Vergleich zur Muskulatur.

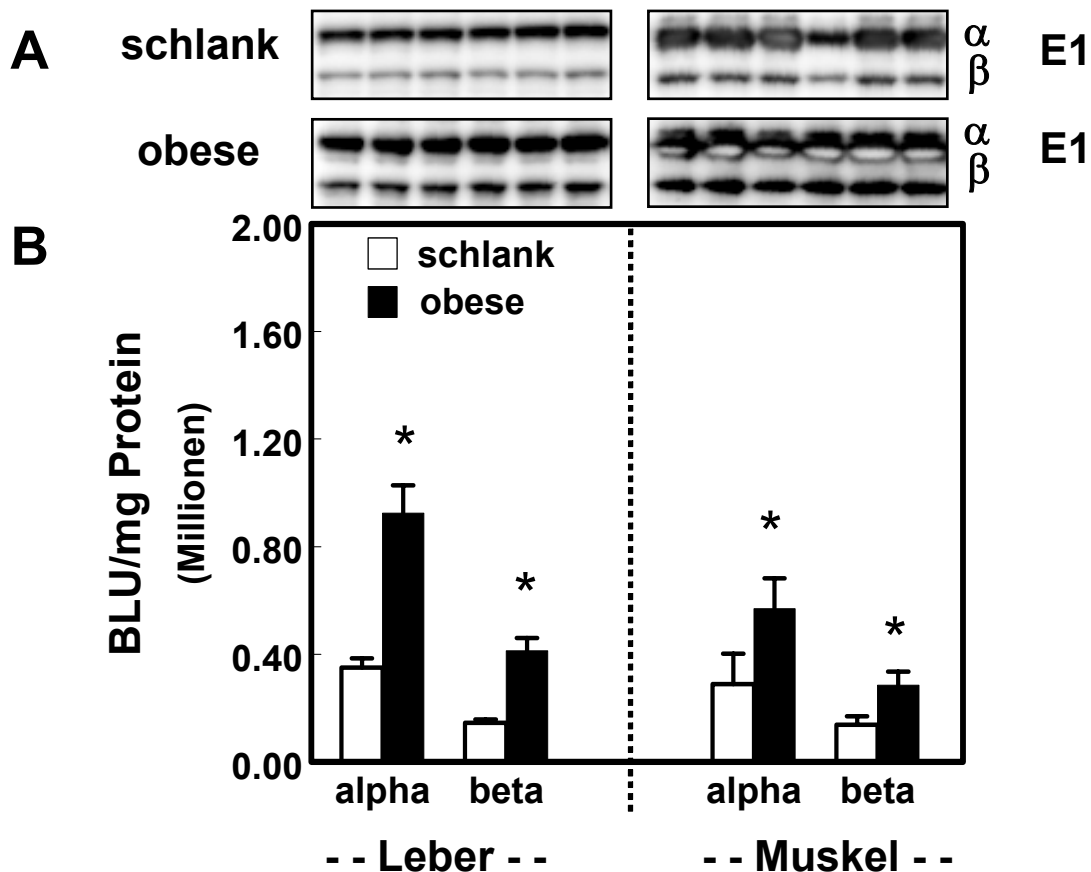


Abb. III-68 Immunologische Detektion (A) und Optische Quantifizierung (B) der Proteinmenge von PDH-E1 α/β in Leber- und Muskelgewebe bei den 16 Wochen alten, gefütterten ZDF-Ratten, schlank vs. obese (Blot von Abb. III-65 rehybridisiert). Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$; * $P < 0,05$ vs. schlank. Die Proteinmenge wurde durch Western-Blot-Analyse bestimmt (s. Kap. II.2.3.c/e) (Die hellen Areale unterhalb der E1 α Bande resultieren aus bereits verbrauchtem ECL-Substrat zum Zeitpunkt der Belichtung).

III.4 DCA Studien

Für die DCA Studien wurden stets über Nacht gehungerte Tiere verwendet, da nach einem Nahrungsentzug von 18 h sowohl in der Leber als auch in der Muskulatur eine signifikante Zunahme der PDK4 (III.3.4.3.b) und damit eine Hemmung der PDH festzustellen war (III.3.4.3.a). Durch diese Nahrungskarenz wurde sozusagen modellhaft eine dem Diabetes ähnliche Hungerstoffwechsellage simuliert.

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob und bis zu welchem Grad die PDH-Aktivität durch einen pharmakologischen Eingriff gesteigert werden kann. Dabei sollte weiterhin überprüft werden, inwiefern die verschiedenen Tiermodelle und Methoden für das Studium von PDK-Inhibitoren geeignet sind.

III.4.1 Akuter Effekt einer ein- und zweimaligen DCA Behandlung auf die PDH-Aktivität und die Glukoseoxidation

Anhand des Blutglukose- und Laktatverlaufs wurde der Effekt von DCA auf die Glukoseoxidation untersucht.

Die Blutglukosewerte (Abb. III-69, A) der schlanken Kontrolltiere bewegten sich bei $\pm 4,1$ mmol/l. Der Blutglukoseverlauf der Gruppe, die eine einmalige DCA Dosis erhielt, entsprach bis zur 2. Stunde dem der Kontrolle. Ab diesem Zeitpunkt begann die Blutglukose zu sinken und lag zum Versuchsende bei 3,4 mmol/l. Bei der Gruppe, die zusätzlich am Vortag behandelt wurde, befand sich die Nüchtern-Blutglukose auf einem niedrigeren Wert von 2,8 mmol/l und blieb auch nach Gabe der zweiten Dosis bis zum Versuchsende auf diesem Niveau.

In der obesen Versuchsgruppe liefen die Werte der Blutglukose (Abb. III-69, B) von Kontrolle und der einmalig behandelten Gruppe parallel (DCA 1x: 10,7 mmol/l bei $t=0$ h und 15,7 mmol/l bei $t=4$ h). Im Gegensatz zu den schlanken Tieren war hier kein Abfall der Blutglukose festzustellen. Analog zu den schlanken ZDF-Ratten verlief die Blutglukose innerhalb der Gruppe mit der zweimaligen DCA Dosis bei niedrigeren Werten: 11,1 mmol/l ($t=0$ h) und 10,1 mmol/l zu Versuchsende.

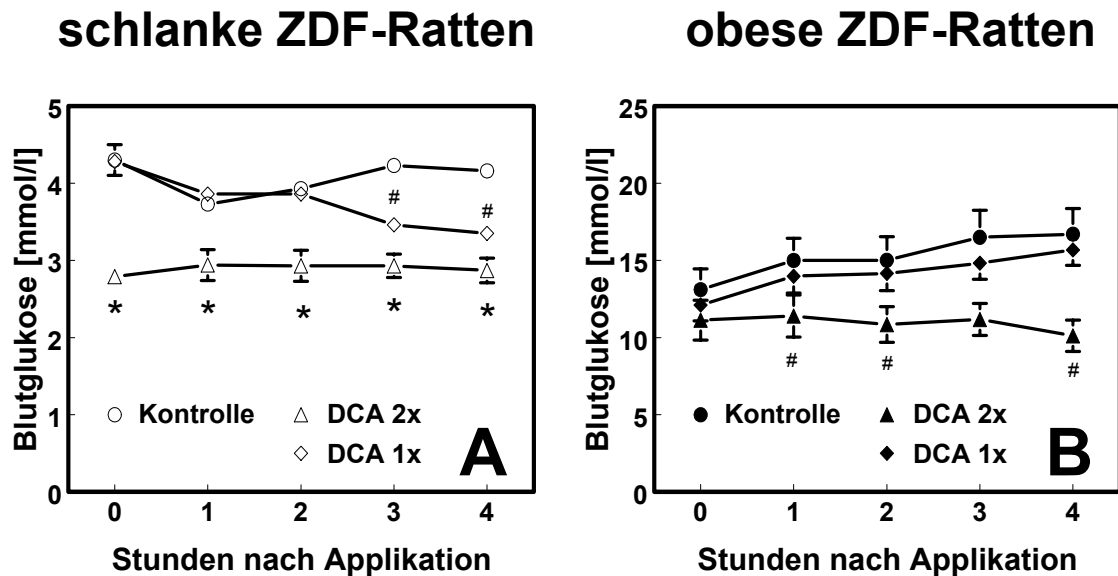


Abb. III-69 Verlauf der Nüchtern-Blutglukose nach einmaliger bzw. zweimaliger DCA Behandlung im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle bei den 18 Wochen alten, schlanken (A) und obesen (B) ZDF-Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$, # $P < 0,05$ vs. Kontrolle, * $P < 0,001$ vs. Kontrolle (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Im Gegensatz zur Blutglukose zeigte sich im Laktatprofil der schlanken Gruppe (Abb. III-70, A) nach einmaliger DCA-Applikation ein unmittelbarer Abfall von 1,7 mmol/l ($t=0h$) auf 0,9 mmol/l ($t=1h$). Bei der Vergleichsgruppe (DCA 2x) lag der Laktatspiegel vor Gabe der zweiten DCA Dosis bereits auf einem niedrigeren Wert (1,3 mmol/l) und fiel bis zur letzten Messung, parallel mit der einfach behandelten Gruppe, weiter auf 0,9 mmol/l ab. In der obesen Gruppe (Abb. III-70, B) war der Verlauf ähnlich: nach Applikation sank der Laktatspiegel (DCA 1x) binnen einer Stunde von 2,4 mmol/l auf 1,0 mmol/l ab und endete nach einem kurzzeitigen Abfall zur 2. Stunde mit diesem Wert. Als Folge der Vortagsbehandlung (DCA 2x) lag der Laktatwert signifikant niedriger bei 1,4 mmol/l, sank nach der zweiten Gabe bis zur 2. h auf 0,6 mmol/l ab und lag am Ende des Versuchs bei 1,4 mmol/l.

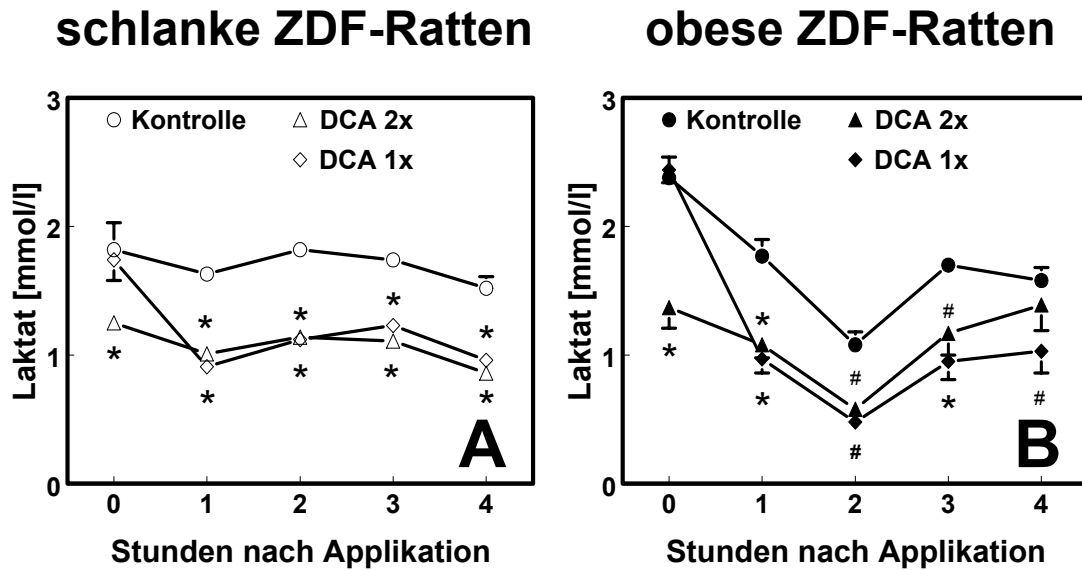


Abb. III-70 Verlauf der Nüchtern-Laktatwerte nach einmaliger bzw. zweimaliger DCA Behandlung im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle bei den 18 Wochen alten, schlanken (**A**) und obesen (**B**) ZDF-Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$, # $P < 0,05$ vs. Kontrolle, * $P < 0,001$ vs. Kontrolle (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Die Bestimmung von Leber- und Muskelglykogen sollte die Frage klären, ob sich eine gesteigerte Glukoseoxidation in einer Verminderung der Glykogenspeicher widerspiegelt.

Die Leberglykogenspeicher (Abb. III-71) der schlanken Tiere waren nach der nächtlichen Nahrungskarenz mit 0,8 mg/g nahezu erschöpft; nach DCA Gabe konnte keine weitere Veränderung beobachtet werden. Bei den obesen Ratten lag der Leberglykogengehalt der behandelten Gruppen um 6,4 mg/g (DCA 1x) bzw. um 21 mg/g (DCA 2x) niedriger als in der Kontrolle (52,8 mg/g).

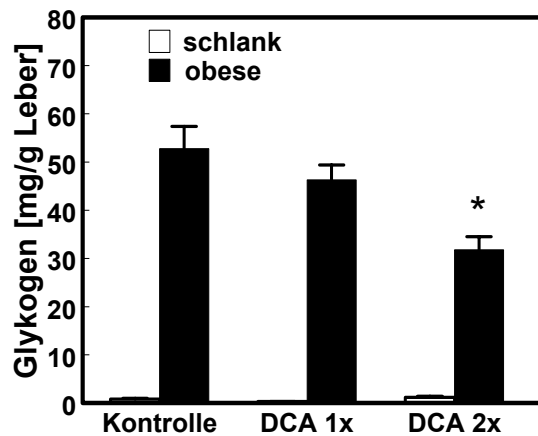


Abb. III-71 Leberglykogen nach einmaliger bzw. zweimaliger DCA Behandlung im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle bei den 18 Wochen alten, schlanken (**A**) und obesen (**B**) ZDF-Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$, * $P < 0,001$ vs. Kontrolle.

In der schlanken Gruppe nahm das Glykogen in der Muskulatur (Abb. III-72) nur nach zweimaliger DCA Behandlung (2,1 mg/g) im Vergleich zur Kontrolle (2,6 mg/g) ab. Bei den obesen Ratten konnte in beiden behandelten Gruppen eine Abnahme des Muskelglykogens festgestellt werden. Der Muskelglykogengehalt war innerhalb der behandelten Gruppe (DCA 2x) im Vergleich zu der Kontrolle (3,5 mg/g) signifikant niedriger.

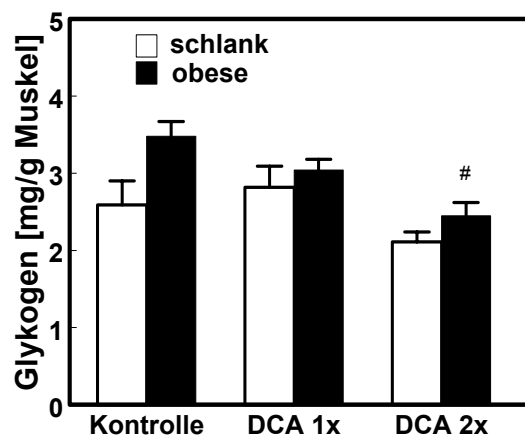


Abb. III-72 Muskelglykogen nach einmaliger bzw. zweimaliger DCA Behandlung im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle bei den 18 Wochen alten, schlanken und obesen ZDF-Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$. # $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

Bei den obesen Versuchstieren lag nach der nächtlichen Nahrungskarenz die PDH-Aktivität in der Leber bei 1,4 mU/mg und im Muskel bei 4,8 mU/mg (Abb. III-73). Die DCA Behandlung führte sowohl in der Leber als auch im Muskel zu einer signifikanten Zunahme der PDH-Aktivität. In der Leber betrug die Enzymaktivität nach der DCA-Applikation 3,3 mU/mg (DCA 1x) bzw. 5,1 mU/mg (DCA 2x). In der Muskulatur verdoppelte sich die PDH-Aktivität bereits nach einer einmaligen Behandlung und konnte durch eine weitere Gabe nicht mehr gesteigert werden.

Die Aktivitätswerte nach Inkubation mit der λ -PPase lagen bei 10,6 mU/mg (Leber) bzw. 12,0 mU/mg (Muskel).

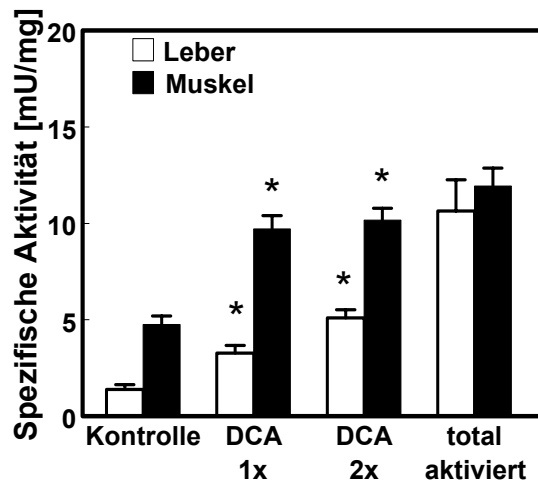


Abb. III-73 PDH-Aktivität in Leber und Muskel nach einmaliger bzw. zweimaliger DCA Behandlung im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle, sowie nach vollständiger (totaler) Aktivierung bei den 18 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$, * $P < 0,001$ vs. Kontrolle.

Aus der Bestimmung der totalen Aktivität mit Hilfe der λ -PPase konnte der prozentuale Anteil der aktiven PDH ermittelt werden (Abb. III-74).

Nach der Hungerperiode von 18 Stunden lag die PDH in der Leber zu 13% und im Muskel zu 40% aktiv vor. Nach der DCA Behandlung war die Leber PDH zu 31% aktiv (DCA 1x) und nach zweimaliger DCA Gabe mit 48% nahezu halbmaximal aktiv. In der Muskulatur lag die PDH nach DCA-Applikation zu 81% bis 85% aktiv vor.

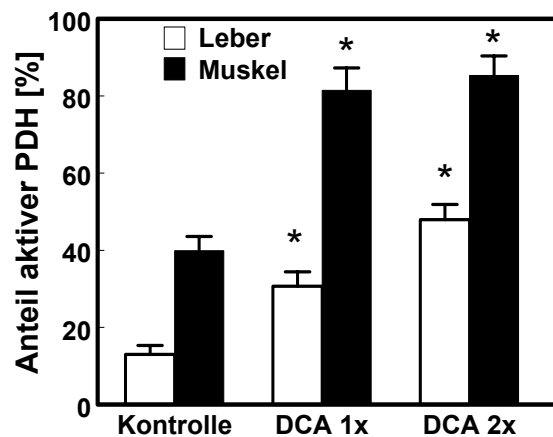


Abb. III-74 Anteil der aktiven PDH in Leber und Muskel nach einmaliger bzw. zweimaliger DCA Behandlung im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle bei den 18 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=6$, $*P < 0,001$ vs. Kontrolle.

Obwohl nach einmaliger DCA-Behandlung obeser ZDF-Ratten eine Steigerung der PDH-Aktivität festgestellt werden konnte (Abb. III-74), die zu einer Senkung der Laktatspiegel (Abb. III-70, B) führte, wurde für den gewählten Versuchszeitraum keine blutglukosesenkende Wirkung beobachtet (Abb. III-69, B). Daher wurde der Versuch auf eine Dauer von acht Stunden ausgedehnt, um zu untersuchen, ob der Blutglukoseabfall möglicherweise verzögert auftritt.

III.4.2 Akuter Effekt einer einmaligen DCA Behandlung auf das Blutglukoseprofil, die Kohlenhydrat- und Fettoxidation

Die Wirkung von DCA wurde zunächst anhand des Nüchtern-Blutglukoseprofils untersucht.

Bei den Wistar Ratten sank unmittelbar nach DCA-Applikation die Blutglukose (Abb. III-75, A) kontinuierlich von 4,0 mmol/l auf 2,7 mmol/l bis zum Versuchsende ab, während die Werte in der Kontrolle mit $\pm 3,8$ mmol/l nahezu konstant blieben. Bei den obesen ZDF-Ratten bewegten sich die Werte der Blutglukose (Abb. III-75, B) innerhalb der Kontrolle bei Werten von 9,8 mmol/l zu Versuchsbeginn und 15,0 mmol/l am Ende des Versuchs. Die Blutglukosewerte der behandelten Gruppe verliefen bis zur 5. Stunde parallel zur Kontrolle, erst ab diesem Zeitpunkt war eine Absenkung der Blutglukose erkennbar und lag nach acht Stunden bei 9,1 mmol/l.

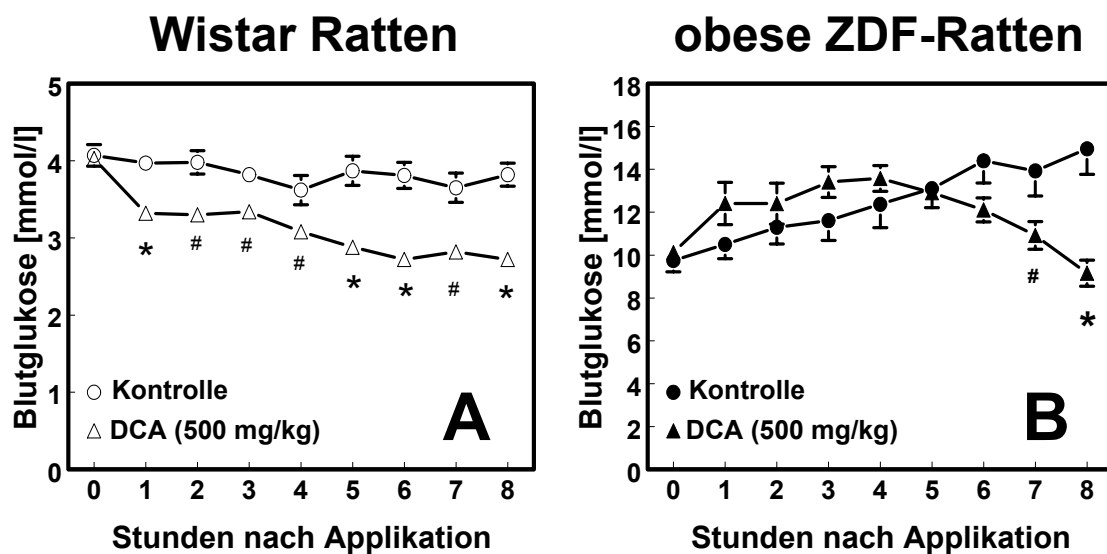


Abb. III-75 Verlauf der Nüchtern-Blutglukose nach einmaliger DCA Behandlung im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle bei den Wistar Ratten (A) und den obesen ZDF-Ratten (B). Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$, # $P < 0,05$ vs. Kontrolle, * $P < 0,001$ vs. Kontrolle (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Der Versuch wurde mit dem gleichen Tierkollektiv wiederholt, diesmal wurde allerdings der RQ für den o.g. Zeitraum bestimmt.

Bei den Wistar Ratten stieg der RQ (Abb. III-76, A) nach DCA Gabe von 0,74 auf 0,77 (t=2h) an und blieb bis zur 8. Stunde konstant bei diesem Wert. Der RQ der Kontrolle lag zu Versuchsanfang- und Ende bei 0,74. Bei den obesen Kontrolltieren bewegte sich der RQ (Abb. III-76, B) während des Versuchszeitraums bei $\pm 0,75$. In der behandelten Gruppe stieg der RQ unmittelbar nach Applikation von 0,78 auf 0,82, sank eine Stunde später auf 0,81 und blieb bis zum Ende des Versuchs konstant.

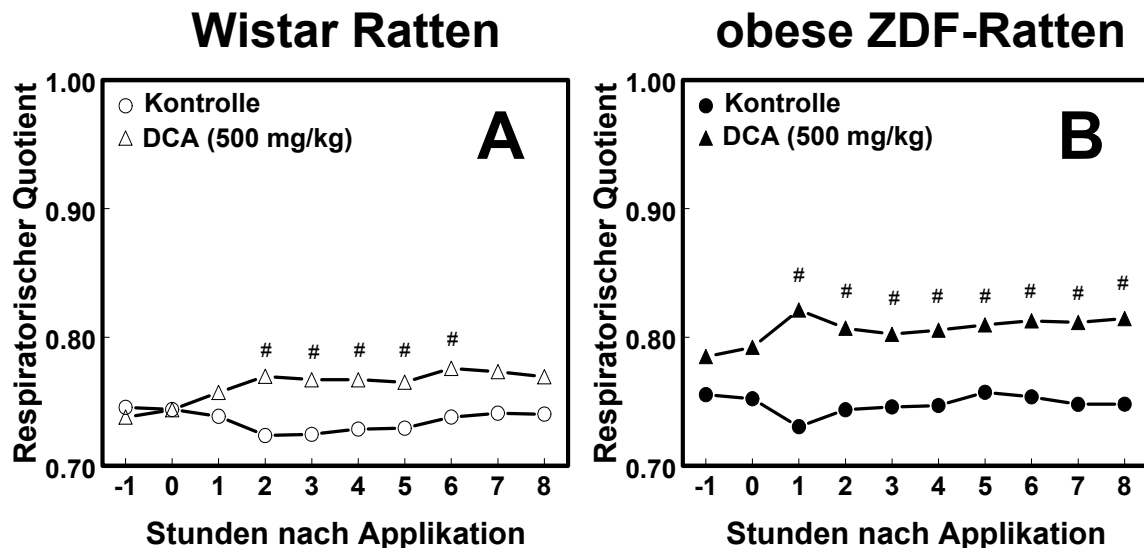


Abb. III-76 Verlauf des Respiratorischen Quotienten nach einmaliger DCA Behandlung im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle bei den Wistar Ratten (A) und den obesen ZDF-Ratten (B). Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=7-8$, $\#P < 0,05$ vs. Kontrolle (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole; der Abfall des RQ bei den obesen ZDF-Kontrolltieren zum Zeitpunkt $t=1$ h war durch das kurzfristige Öffnen der Stoffwechselkäfige bedingt).

Um den Effekt von DCA auf den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel quantitativ darzustellen, wurde anhand der Atemgasanalyse neben dem RQ auch die KHO und die FO berechnet.

Bei den Wistar Ratten fiel die KHO (Abb. III-77, A) von Anfang der Hungerphase bis zum eigentlichen Versuchsbeginn ($t=0h$) in beiden Gruppen kontinuierlich auf 22 mg/h/Tier ab. Unmittelbar nach Applikation stieg die KHO in der behandelten Gruppe auf 74 mg/h/Tier an und lag am Versuchsende bei 64 mg/h/Tier, während die KHO der Kontrolle bis zum Versuchsende um einen Wert von ± 23 mg/h/Tier schwankte. Bei den obesen ZDF-Ratten zeigte sich ein ähnliches Bild, hier lagen jedoch die Werte der KHO (Abb. III-77, B) zwischen der Kontrolle und den behandelten Tieren nach der Applikation in einem größeren Abstand zueinander. Die KHO fiel in beiden Gruppen nach Nahrungsentzug von 225 mg/h/Tier auf 65 mg/h/Tier ab ($t=-2h$), erhöhte sich nach der Behandlung kurzfristig auf 117 mg/h/Tier, lag eine Stunde später bei 94 mg/h/Tier und änderte sich bis zum Ende des Versuches kaum. Bei der Kontrolle schwankte die KHO bis zur 8. Stunde bei Werten um ± 20 mg/h/Tier.

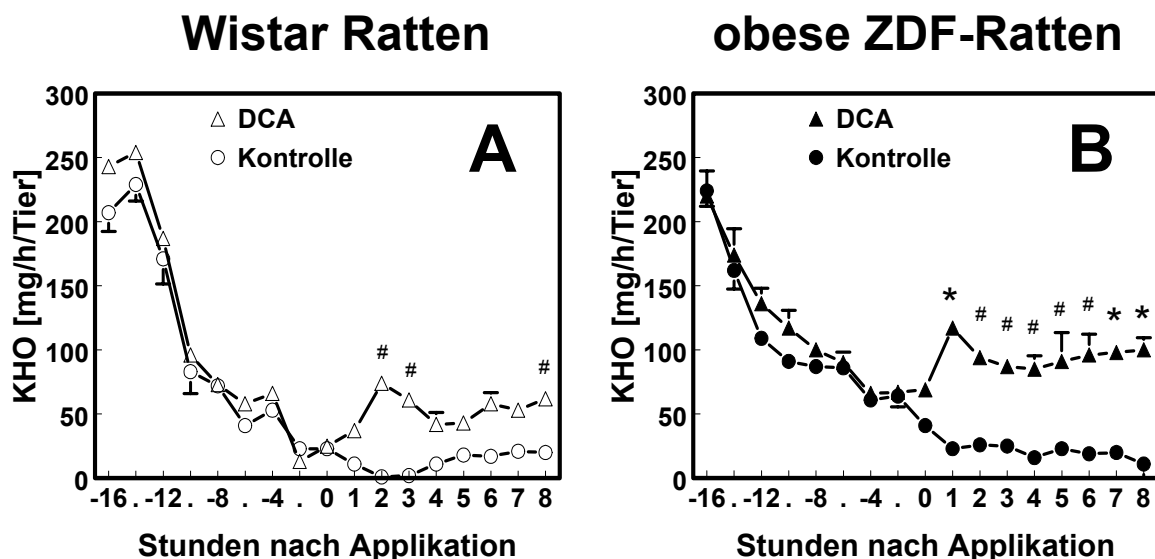


Abb. III-77 Verlauf der KHO bei den Wistar Ratten (A) und den obesen ZDF-Ratten (B), Kontrolle vs. DCA Behandlung. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=7-8$, # $P < 0,05$ vs. Kontrolle, * $P < 0,001$ vs. Kontrolle (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Die FO (Abb. III-78, A) der Wistar Ratten verhielt sich im Vergleich zur KHO umgekehrt spiegelbildlich (Abb. III-77, A). Nach dem Nahrungsentzug stieg die FO in beiden Gruppen zeitgleich an ($t = -2\text{h}$: 171 mg/h/Tier). In der behandelten Gruppe fiel die FO auf 120 mg/h/Tier ($t = 2\text{h}$) ab und betrug bei der letzten Messung 135 mg/h/Tier. Die FO der Kontrolle blieb mit 166 mg/h/Tier zum Zeitpunkt $t = 0\text{ h}$ und zum Ende des Versuchs unverändert.

Bei den ZDF-Ratten (Kontrolle) erhöhte sich die FO (Abb. III-78, B) während der gesamten Nahrungskarenz von der ersten bis zur letzten Messung von 80 auf 120 mg/h/Tier. In der behandelten Gruppe fiel die FO unmittelbar nach Applikation auf 75 mg/h/Tier ab und blieb bis zum Versuchsende konstant.

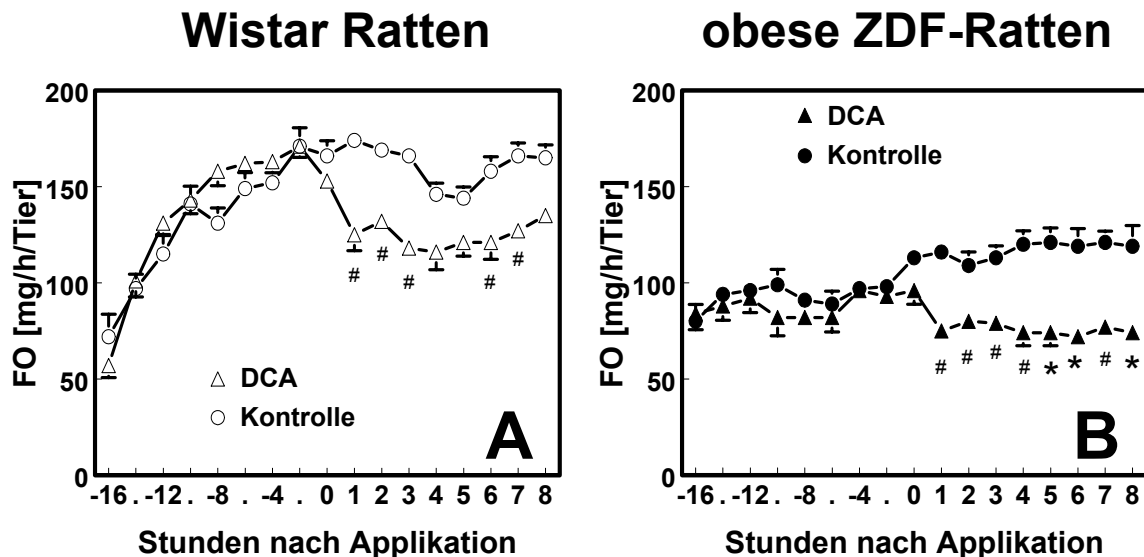


Abb. III-78 Verlauf der FO bei den Wistar Ratten (**A**) und den obesen ZDF-Ratten (**B**), Kontrolle vs. DCA Behandlung. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=7-8$, $\#P < 0,05$ vs. Kontrolle, $*P < 0,001$ vs. Kontrolle (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Um den Zusammenhang zwischen Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel beim Übergang vom gefütterten in den gehungerten Zustand zu verdeutlichen, wurde für die Kontrollen (Abb. III-79, A/B) und die behandelten Gruppen (Abb. III-79, C/D) die KHO und die FO jeweils in einer gemeinsamen Graphik dargestellt.

Der Verlauf der KHO und der FO ergab schematisch gesehen das Bild einer „Schere“, in deren Schnittpunkt die Umstellung von Glukose- auf Lipidoxidation deutlich wird. Nach DCA Behandlung näherten (Abb. III-79, C) sich die beiden Kurven der KHO und der FO, bzw. liefen parallel (Abb. III-79, D).

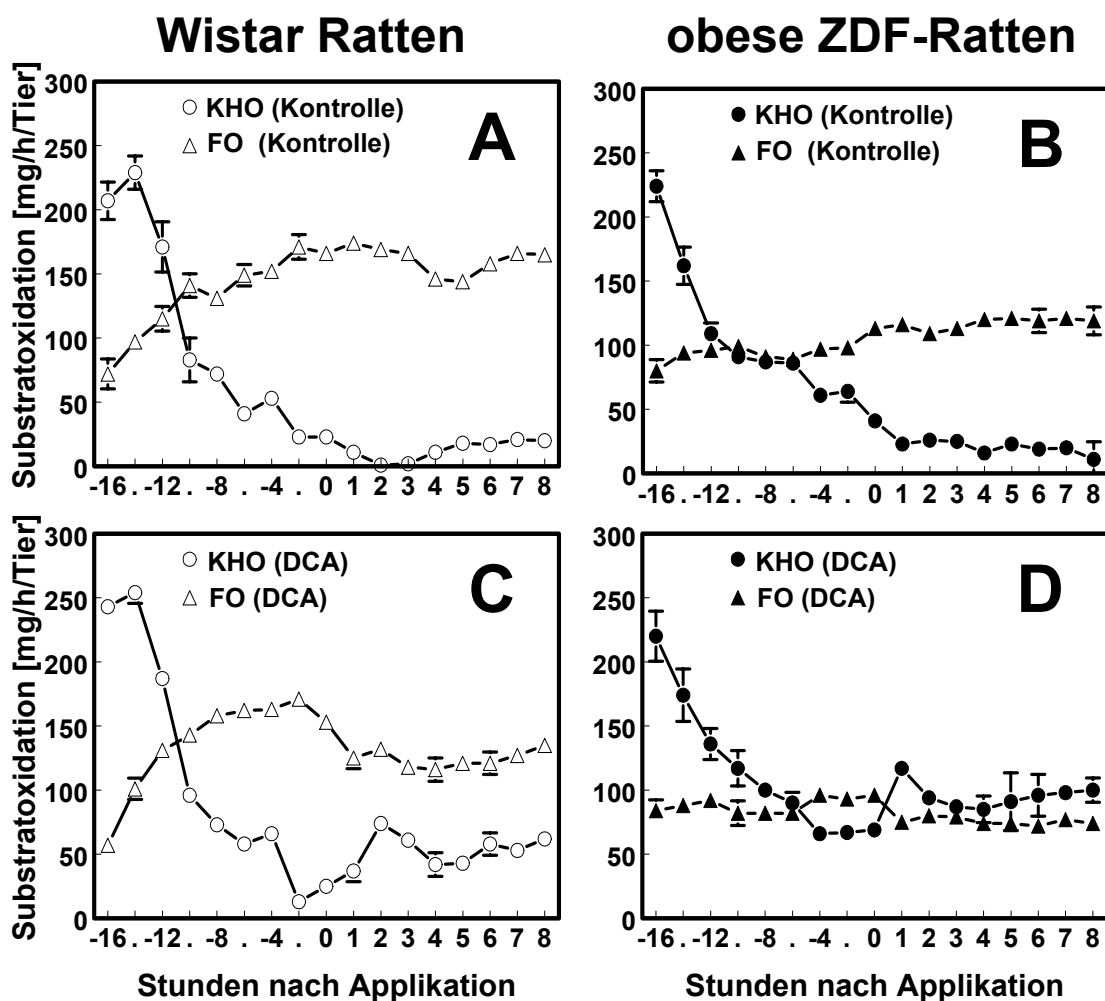


Abb. III-79 Verlauf der Substratoxidation (KHO und FO) bei den unbehandelten Wistar (A) und ZDF-Ratten (B), sowie bei den DCA behandelten Wistar (C) und obesen ZDF-Ratten (D). Werte sind Mittelwerte \pm SEM, n=7-8 (im Falle nicht sichtbarer Fehlerbalken sind diese kleiner als die abgebildeten Symbole).

Um den Effekt der DCA Behandlung zu quantifizieren, wurden für den gesamten Zeitraum nach der Applikation (8 h) die KHO und die FO berechnet.

Die DCA-Applikation steigerte die KHO (Abb. III-80) um den Faktor 4,3 (Wistar Ratten) bzw. 4,7 (obese ZDF-Ratten) im Vergleich zur Kontrolle (schlank: 101 mg/8h/Tier, obese: 163 mg/8h/Tier).

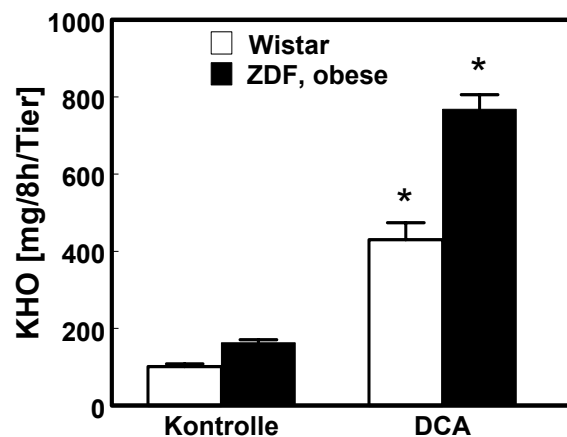


Abb. III-80 KHO bei den Wistar Ratten und den obesen ZDF-Ratten, berechnet über 8 Stunden, Kontrolle vs. DCA Behandlung. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=7-8$, $*P < 0,001$ vs. Kontrolle.

Umgekehrt verhielt es sich bei der FO (Abb. III-81): in den behandelten Gruppen lag die FO um 23% (Wistar Ratten) bzw. 36% (obese ZDF-Ratten) niedriger als in den unbehandelten Vergleichsgruppen (schlank: 1288 mg/8h/Tier, obese: 938 mg/8h/Tier).

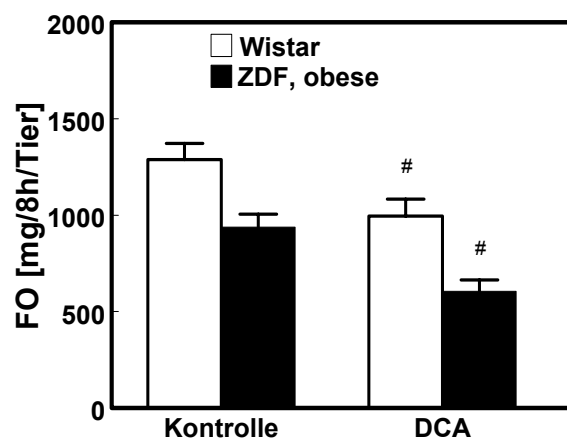


Abb. III-81 FO bei den Wistar Ratten und den obesen ZDF-Ratten, berechnet über 8 Stunden, Kontrolle vs. DCA Behandlung. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=7-8$, $\#P < 0,05$ vs. Kontrolle.

Um den Einfluss des Leberstoffwechsels auf die Konstanthaltung der Blutglukose zu untersuchen, wurde nach Versuchsende bei schlanken und obesen Tieren Leberglykogen bestimmt (Abb. III-82).

Bei den Wistar Ratten konnte zwischen der Kontrolle (1,8 mg) und der behandelten Gruppe kein Unterschied festgestellt werden. Bei den obesen ZDF-Ratten lag der Leberglykogengehalt nach Behandlung mit 316 mg um 66% niedriger als in der Kontrolle (962 mg).

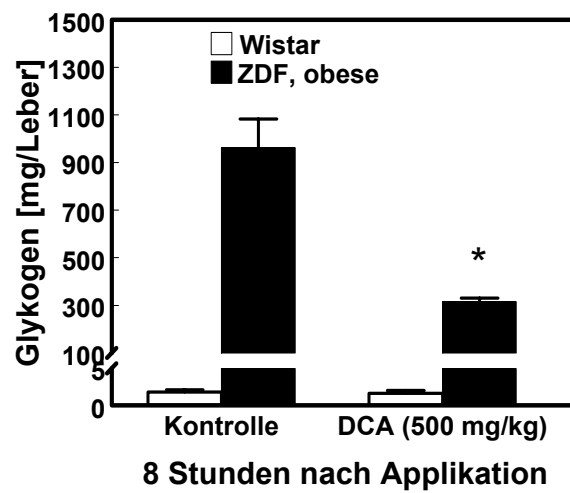


Abb. III-82 Leberglykogengehalt acht Stunden nach einmaliger DCA Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei den Wistar Ratten und den obesen ZDF-Ratten. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=8$, $*P < 0,001$ vs. Kontrolle.

IV Diskussion

Die Aufgabenstellung dieser Dissertation war es, die (Patho)physiologie des oxidativen und nicht-oxidativen Glukosestoffwechsels sowie die (Patho)biochemie des PDH-Komplexes am Tiermodell der Ratte zu untersuchen.

Zum Studium der Blutglukosehomöostase wurde als zentrale Methode der oGTT gewählt.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnten einige bisher unbekannte Erkenntnisse gewonnen werden:

- Die Kohlenhydratoxidation obeser ZDF-Ratten ist im Vergleich zu der insulinsensitiver, schlanker Tiere nicht gestört
- Die totale spezifische Aktivität der PDH in Leber und Muskel ist bei obesen ZDF-Ratten erhöht
- Die spezifische Aktivität der PDH erhöht sich nach oral applizierter Glukose ohne Verzögerung binnen weniger Minuten
- Nach einer oralen Glukosebelastung erreicht die Aktivität des PDH-Komplexes Werte, die über denen gefütterter Tiere liegen
- Die PDK4 wird auf Proteinebene während eines oGTT unerwartet schnell reguliert
- Die Proteinspiegel der E1 α / β Untereinheit des PDH-Komplexes sind bei obesen ZDF-Ratten erhöht
- Nach nächtlicher Nahrungskarenz bedingt der hohe Leberglykogenvorrat obeser, diabetischer ZDF-Ratten einen verzögerten Abfall der Blutglukose bei pharmakologisch gesteigerter PDH-Aktivierung und KHO

IV.1 in vivo Ergebnisse - oGTT

IV.1.1 oGTT – Wistar Ratten

In Vorversuchen wurde zunächst bei Wistar Ratten eine geeignete Dosis für die orale Glukosebelastung ermittelt (Kap. III.1).

Nimmt man ein Durchschnittsgewicht des Menschen von 75 kg an, so wäre unter Standardbedingungen die Dosis in einem oGTT, bei Einnahme von 75 g Glukose, 1g pro kg KM. Dieses Verhältnis wurde auch im Tiermodell gewählt, daneben wurde auch die halbe (0,5 g/kg KM) und die doppelte Dosis (2 g/kg KM) verwendet.

Bei Betrachtung der Blutglukoseverläufe (Kap. III.1.1; Abb. III-1) und der AUC (Kap. III.1.1; Abb. III-2, B) zeigte sich eine deutliche Dosisabhängigkeit. Die Linearität der Konzentrationsreihe spiegelte sich jedoch nicht in den Werten der berechneten AUC wider. Dies war jedoch auch zu erwarten, da biologische Prozesse meist keinen linearen Gesetzmäßigkeiten unterliegen, sondern eher mit Potenzfunktionen zu beschreiben bzw. logarithmischer Natur sind.

Dieses Prinzip zeigte sich bei der Betrachtung der KHO (Kap. III.1.2; Abb. III-4, B); während bei den beiden niedrigen Dosen die KHO zu jedem Zeitpunkt des Versuchszeitraums nur geringfügig über den basalen Werten lag, führte die Glukoseapplikation von 2 g/kg KM zu einem signifikanten und sprunghaften Anstieg der KHO und lag um das 10-fache höher als in der niedrigsten Dosis. So wurden bei den Dosen von 0,5 und 1 g/kg über einen Zeitraum von drei Stunden nur etwa 10% der applizierten Glukose oxidiert, während in der höchsten Dosis der Anteil der KHO ca. 30% ausmachte.

Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass es für die zirkulierende Blutglukose einen gewissen Schwellenwert gibt, ab dem die Blutglukose vermehrt oxidiert wird, wobei der Übergang nicht fließend ist. Unterhalb dieses Bereichs überwiegt der nicht-oxidative Glukosestoffwechsel.

Die Glukosedosis von 2 g/kg KM wurde als geeignete Konzentration für den oGTT angesehen, da der prozentuale Wert der KHO den Daten aus Studien am Hund (Cherrington, 1999) und am Menschen (Kelley et al., 1988) am nächsten kam.

Der Stellenwert des PDH-Komplexes im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit stützt auch diese Wahl, da bei einer KHO von ca. 30% ein signifikanter Fluss über dieses Enzym zu erwarten ist.

Bei den interindividuellen Studien wurden die Stoffwechseländerungen anhand verschiedener Parameter im Blutbild untersucht und durch die Bestimmung von Leber- und Muskelglykogen abschließend das Schicksal der applizierten Glukose bilanziert (Kap. III.1.4). Die Veränderungen dieser Parameter entsprechen denen des Menschen (Löffler u. Petrides, 1997).

Nach einer Hungerperiode sinkt die Blutglukose, somit parallel deren stimulierende Wirkung auf die Insulinfreisetzung. Das antilipolytisch wirkende Insulin sinkt, reziprok steigt Glukagon. Das Überwiegen der lipolytischen Wirkung im Zusammenspiel der beiden Hormone führt zu einer vermehrten Freisetzung von Glycerol und FFS aus dem Fettgewebe. Die FFS werden von der Leber aufgenommen und über die β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut. Dessen Eintritt in den Citratzyklus hängt von der Verfügbarkeit an Oxalacetat ab, das jedoch vermehrt zur Glukoneogenese genutzt wird, so dass die FFS zunehmend über den Umweg der Ketonkörperproduktion abgebaut werden. Damit die Versorgung von Geweben, die obligat auf Glukose angewiesen sind, sichergestellt wird, steigt bei ausbleibender exogener Glukosezufuhr die endogene Produktion über Glukoneogenese und Glykogenolyse. Nach der Nahrungskarenz von 18 Stunden sind die Glykogenvorräte in der Leber nahezu erschöpft (Abb. III-10). In der Muskulatur wird das Glykogen nur zum Eigenbedarf abgebaut, daher sind die Speicher hier nicht verbraucht (Abb. III-10).

Nach Applikation der Glukose steigt Insulin (Abb. III-5, B) schnell an und führt zu einer Absenkung der Blutglukose (Abb. III-5, A). Durch die Wirkung von Insulin wird die Abgabe der FFS (Abb. III-7, A) und folglich die Ketonkörpersynthese gehemmt (Abb. III-8). Zusätzlich aktiviert Insulin die Lipoproteinlipase im Fettgewebe und senkt die TG.

Bei der Glukoseresorption wird unmittelbar im Darm Glukose umgesetzt, wobei geschätzt wird, dass etwa 5% der Glukose in Laktat, Pyruvat und Alanin umgebaut werden (Bjorkman et al., 1990), was zu einem Laktatanstieg (Abb. III-6) während des oGTT führt.

Nach ihrer Resorption aus dem Darm passiert die Glukose die Leber, von der sie aufgenommen wird; Insulin stimuliert die Glykogensynthase und fördert damit den Einbau der Glukose in Leberglykogen (Abb. III-10). An der Muskulatur führt Insulin zu

einer Aktivierung von GLUT-4, über welche die Glukose in die Zelle aufgenommen und ebenfalls als Glykogen gespeichert wird (Abb. III-10).

Die Bilanzierung (Kap. III.1.4, Abb. III-13) zeigt, dass der größte Anteil der applizierten Glukose, der erfasst werden konnte, oxidiert wurde, während nur etwa die Hälfte dieser Menge in Leber und Muskel gespeichert wurde.

Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen (2 g Glukose pro kg KM) bei den Wistar Ratten der oxidative Glukosestoffwechsel im Vergleich zur Speicherung in Leber und Muskel, die sich in etwa die Waage hielten, die dominierende Rolle spielte. Interessanterweise wurde in der Leber nur etwa die Hälfte der nicht-oxidativ verstoffwechselten Glukose in Form von Leberglykogen gespeichert, die andere Hälfte verblieb als freie Glukose. Bei den Wistar Ratten wurde somit weniger Glykogen gespeichert in Bezug auf die applizierte Glukosemenge als in Humanstudien geschätzt wurde (Kelley et al., 1988). Allerdings muss auch berücksichtigt werden, dass in den Studien am Menschen keine direkten Glykogenbestimmungen im Gewebe erfolgten. Außerdem werden durch diese angewendeten Methoden und Techniken nur die Konzentrationsänderungen im Blut bzw. vor und nach Passieren der Leber erfasst, dabei wird der in die Leber aufgenommene Anteil der Glukose gleichgesetzt mit Glykogenspeicherung. Durch diese Annahme bzw. Kalkulation könnten sich auch die höheren Werte dieser Schätzungen erklären.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Bestimmung der freien Glukose für quantitative Studien nicht vernachlässigt werden darf. Von der freien Glukose wird angenommen, dass diese als „Pool“ die Glykogensynthese speist (Schimassek, 1993).

IV.1.2 oGTT – 8 Wochen alte ZDF-Ratten

Die Ergebnisse der obesen ZDF-Ratten zeigen, dass sich diese Altersgruppe bereits in einem prädiabetischen Zustand befand. Die Tiere waren jedoch aufgrund der kompensatorischen Hyperinsulinämie (Kap. III.2.4.1.a; Abb. III-19, B) noch annähernd normoglykämisch (Abb. III-14, B). Die ca. doppelt so große AUC der Blutglukose (Kap. III.2.1; Abb. III-15, B) der obesen Tiere verdeutlicht, wie unterschiedlich die Glukose von den Tieren toleriert wurde. Aufgrund der vorhandenen Insulinresistenz der obesen Tiere konnte die zirkulierende Glukose trotz der bestehenden Hyperinsulinämie nicht wie bei den gesunden, schlanken Tieren verstoffwechselt werden.

Die durch den Leptinrezeptordefekt bedingte Hyperphagie der obesen Tiere (Zucker, 1965) spiegelte sich in der Hypertriglyzeridämie im Serum (Kap. III.2.4.1.a; Abb. III-21, B) und in der Leber (III.2.4.1.b; Abb. III-32) wider. Die Werte der FFS (Kap. III.2.4.1.a; Abb. III-21, A) und der Ketonkörper (Abb. III-22) obeser Tiere lagen unter gefütterten Bedingungen jedoch auf dem Niveau der schlanken Ratten. In diesem Stadium war die hemmende Wirkung von Insulin auf die Lipolyse also noch gegeben.

Im Leberstoffwechsel fanden sich weitere grundlegende Unterschiede zwischen schlanken und obesen Tieren; unter gefütterten Bedingungen verfügten obese Ratten über signifikant höhere Mengen an Glykogen und freier Glukose in der Leber. Nach dem Hungern waren diese Vorräte bei den schlanken Tieren nahezu erschöpft, während obese Tiere immer noch über ausreichende Vorräte verfügten (Abb. III-25).

In dieser Beziehung unterscheidet sich das obese Tiermodell auch von der Pathophysiologie des humanen Typ 2 Diabetes (Krssak et al., 2004). Das Phänomen dieser stabilen Glykogenspeicher wurde bereits für ZF-Ratten (Triscari et al., 1980) und ZDF-Ratten (Beha, 2004) berichtet. Die Ursache liegt womöglich in einer erhöhten Glukoneogeneserate obeser Tiere (Jin et al., 2005).

G6P und F6P entstammen im Hungerzustand, bei ATP-Mangel, sowohl aus der Glukoneogenese als auch aus der Glykogenolyse. Bei den schlanken ZDF-Ratten kann bei Nahrungskarenz der G6P-Spiegel in der Leber (Abb. III-28, A) wegen der Erschöpfung der Glykogenspeicher (Abb. III-25, A) hauptsächlich aus der Glukoneogenese resultieren. Bei den obesen ZDF-Ratten stellt sich nach einer

Hungerphase die Situation ganz anders dar: die Tiere befanden sich zu keinem Zeitpunkt in einem ATP-Defizit, G6P und F6P sanken kaum. Die konstanten Spiegel der o.g. Metaboliten lassen sich bei diesen Tieren v.a. als Resultat andauernder Glykogenolyse erklären, da die obesen Ratten noch über beträchtliche Glykogenmengen verfügen.

Nach der oralen Glukosegabe wird vermehrt Glukose über die Glykolyse abgebaut, was zu einem Anstieg von G6P und F6P führt. Damit steigt auch die Menge an verfügbarem ATP.

Betrachtet man die Dynamik im nicht-oxidativen Glukosestoffwechsel in der Leber anhand der freien Glukose, G6P und Glykogen, so verhielten sich schlanke und obese Tiere unterschiedlich.

Während des gesamten oGTT nahm bei den schlanken Tieren die Menge an freier Glukose und G6P zu, während diese Metabolite bei den obesen Ratten zu Versuchsende wieder auf Höhe der Ausgangswerte lagen. Die freie Glukose wurde bereits als Pool für die Glykogensynthese angesprochen. So könnte es sein, dass bei den schlanken Ratten der Vorgang der Glykogensynthese im Gegensatz zu den obesen Ratten noch gar nicht abgeschlossen war. Auch der Verlauf des Leberglykogens (Abb. III-25) lässt diese Tendenz erkennen. Womöglich übersteigt bei den schlanken Ratten die Geschwindigkeit der Glukoseaufnahme die der Glykogensynthese. Um diese Annahme zu erforschen, wäre die Bestimmung der Aktivität der Leberglykogensynthase zu Versuchsende und/oder ein weiterer Messzeitpunkt zur 4. Stunde notwendig.

Der Vergleich des RQ (Kap. III.2.2; Abb. III-16) beider Gruppen ließ eine ungestörte Glukoseoxidation des obesen Kollektivs erkennen. Der RQ stieg zeitgleich und fiel zeitverzögert ab. Die geschätzte KHO (Abb. III-18) zeigt, dass die Substratoxidation über der der schlanken Gruppe lag.

Folglich stellt sich die Frage, ob die KHO der obesen Tiere absolut oder relativ erhöht war.

Der obesen Gruppe wurde aufgrund ihres höheren Körpergewichtes relativ mehr Glukose appliziert (Kap. III.2; Tabelle III-5). Die Tiere könnten infolgedessen auch mehr Glukose oxidieren. Jedoch ist die KHO auf die Körpermasse bezogen mit 0,9 mg/g KM (obese) dennoch höher als bei den schlanken Tieren (0,7 mg/g KM).

Warum die KHO der obesen Tiere paradoxerweise höher war als die der schlanken ZDF-Ratten, ist eine weitere offene Frage.

Die Ergebnisse der biochemischen Analysen zeigen, dass zu keinem Zeitpunkt des oGTT die Aktivität der PDH (Kap. III.2.4.3.a; Abb. III-37) in den Geweben der obesen Tiere höher war als bei den schlanken ZDF-Ratten. Folglich ist eine höhere Glukoseoxidation durch einen erhöhten Substratfluss über die PDH in den Krebs-Zyklus unwahrscheinlich.

Die gesteigerte Kohlenhydratoxidation der obesen Tiere könnte sich aus den unten genannten Stoffwechselprozessen erklären, die die Interpretation der Atemgasanalyse beeinflussen.

Bei Kohlenhydratzufuhr können, unter dem Einfluss von Insulin, Fettsäuren und TG de novo synthetisiert werden, d.h. aus Glukose können über das durch die PDH produzierte Acetyl-CoA Fettsäuren entstehen. Dieser Stoffwechselweg spielt bei Ratten eine große Rolle (Löffler u. Petrides, 1997). In vitro und in vivo Studien belegen, dass im Vergleich zu schlanken Ratten bei den obesen Tieren die Lipogeneserate erhöht ist (McCune et al., 1981) bzw. die Fettsäureoxidation stärker supprimiert ist (Beha, 2004).

Bei diesem Nährstoffumbau wird Sauerstoff frei, da Fettsäuren im Vergleich zu Kohlenhydraten weniger Sauerstoff enthalten. Als Folge sinkt die über die Lunge aufgenommene Sauerstoff-Menge (Ulmer, 1997) und daraufhin erhöhen sich der RQ und die errechnete KHO.

Der Anteil der KHO, der durch die indirekte Kalorimetrie ermittelt wird, repräsentiert die Summe der „wahren“ KHO und der Rate, die in Fett umgewandelt wird (Schutz, 1995). Es wäre daher korrekter, den Begriff der Kohlenhydratverwertung (Frayn, 1983) zu verwenden. Die indirekte Kalorimetrie überschätzt die aktuelle Rate der KHO, wenn Lipogenese aus Glukose erfolgt (Schutz, 1977).

Für die Fettsäurebiosynthese müssen Reduktionsäquivalente in Form von NADPH bereitgestellt werden, die über den Pentosephosphatweg generiert werden, der ebenfalls im Fettgewebe besonders aktiv ist (Stryer, 1988). Das bei der Decarboxylierung von Glukose zur Pentose freiwerdende CO₂ addiert sich zu dem beim vollständigen Abbau von Glukose freigesetzten CO₂ und erhöht dadurch ebenfalls den RQ und die errechnete KHO. Ein verstärkter Fluss der Glukose durch den Pentosephosphatweg könnte daher eine weitere mögliche Fehlerquelle bei der Bestimmung der KHO sein.

Bei diesem Tierkollektiv wurde auch der Anteil der Glukose im Urin nach dem oGTT untersucht. Der renale Verlust an applizierter Glukose spielte bei den prädiabetischen Ratten noch keine Rolle.

Wie auch bei den Wistar Ratten lag der Anteil der Glukoseoxidation quantitativ über den in Leber und Muskel gespeicherten Glukosemengen. Der Anteil des Muskelglykogens war zwischen schlanken und obesen Tieren vergleichbar. Der größte Unterschied lag in der Leberglykogenmenge. Während im oGTT bei den obesen Tieren gleich viel Glykogen in Leber und Muskel gespeichert wurde, war der Anteil von freier Glukose und Glykogen in der Leber der schlanken Tiere minimal.

IV.1.3 oGTT – 16 Wochen alte ZDF-Ratten

Die 16 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten befanden sich zu diesem Zeitpunkt in einem Diabetesstadium mit einer massiven Hyperglykämie (Kap. III.3.4.1.a; Abb. III-46, A). In diesem Entwicklungsstadium ist bereits ein Großteil der pankreatischen β -Zellen lipoapoptotisch zugrunde gegangen (Unger, 2002). Als Folge dieser verminderten Sekretionskapazität lagen die Insulinspiegel (Abb. III-46, B) unter denen der 8 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten (Kap. III.2.4.1.a; Abb. III-19, B), jedoch höher als die der 16 Wochen alten, schlanken Tiere, obwohl diese mehr funktionsfähige β -Zellen besitzen.

Im oGTT konnte demonstriert werden, dass sich die 16 Wochen alten Tiere nicht mehr im Stadium einer gestörten Glukosetoleranz befanden, sondern dass der Diabetes nun manifest war. Während bei den 8 Wochen alten Tieren die Blutglukosewerte (Kap. III.2.1; Abb. III-14, B) am Ende des Versuchs zu den Ausgangswerten zurückkehrten, konnten diese bei den 16 Wochen alten Tieren nicht mehr erreicht werden (Kap. III.3.1; Abb. III-42, A). Auch die um den Faktor 3,3 erhöhte Blutglukose-AUC (Abb. III-42, B) verdeutlicht die Dekompensation der Blutglukosehomöostase.

Am Beispiel dieses Versuchs kann die Definition der Insulinresistenz (Yki-Järvinen, 2004) verdeutlicht werden. Die Insulinresistenz der obesen Tiere ist gekennzeichnet durch die Unfähigkeit des Insulins, seine biologischen Effekte bei zirkulierenden Konzentrationen zu entfalten, die bei schlanken Tieren effektiv eine Blutglukosesenkung bewirken.

Anders als bei den prädiabetischen Tieren konnte eine Glukosurie festgestellt werden (Kap. III.3.3; Tabelle III-12). Die Tiere befanden sich durch die Mobilisierung und Ausscheidung von Energiereserven in einer katabolen Stoffwechsellage.

Die Insulinresistenz führt zu einer verstärkten Lipolyse. Diese zeigte sich nicht in erhöhten Spiegeln der FFS (Kap. III.3.4.1.a; Abb. III-48, A), sondern indirekt durch die vermehrten Leber-TG (Kap. III.3.4.1.b; Abb. III-59). Die Speicherung von TG in der Leber ist ein Prozess, durch den die Leber die Körpergewebe vor einem Überschuss an lipotoxischen FFS im Plasma schützt (Gibbons et al., 2004).

Der Hypertriglyzeridämie (Abb. III-48, B) beim Typ 2 Diabetes liegt eine Vermehrung der VLDL-Spiegel zugrunde (Grundy, 1997). Die Erhöhung dieser Lipoproteine sehr geringer Dichte liegt zum einen in der verminderten Aktivität der Lipoproteinlipase begründet, zum anderen findet bei Insulinresistenz eine verminderte Suppression der VLDL Sekretion in der Leber statt (Malmström et al., 1997).

Die erhöhten TG werden charakteristischerweise mit verminderten Spiegeln von Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) gefunden. Diese sogenannte diabetische Dyslipoproteinämie wird auch als Marker des metabolischen Syndroms beschrieben (Reaven, 1988). Die reziprok erhöhten Lipoproteine niedriger Dichte (LDL) bedingen als cholesterinreiche Lipoproteinfraktion den Anstieg des Gesamtcholesterins im Blut (Abb. III-50).

Interessanterweise ergab die Betrachtung des RQ (Kap. III.3.2; Abb. III-43) der beiden Gruppen (schlank/obese) aus dem 16 Wochen alten Kollektiv keinen Hinweis auf eine gestörte Glukoseoxidation. Die KHO der obesen Tiere (Abb. III-45) lag ebenso wie bei den 8 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten (Kap. III.2.2; Abb. III-18) über der der schlanken Tiere. Vergleicht man hier jedoch die absoluten Werte, so war die KHO mit 0,7 mg/g KM bei beiden Gruppen vergleichbar.

Die ungestörte Glukoseoxidation der obesen Ratten deutet darauf hin, dass allein durch den Masseneffekt der Hyperglykämie eine mit den schlanken Tieren vergleichbare KHO erfolgt, unabhängig von einer gestörten Insulinantwort- und/oder Wirkung. Auch in Studien am Menschen konnte gezeigt werden, dass allein durch eine Hyperglykämie die KHO gesteigert ist, unabhängig von den Plasmainsulinspiegeln (Chevaux et al., 1976).

In der Bilanzierung der applizierten Glukose war der oxidierte Anteil bei beiden insulin sensitiven, schlanken Altersgruppen ähnlich (III.2.4.2: Abb. III-33, Kap. III.3.4.2: III-60). Der größte Teil der applizierten Glukose wurde oxidiert: 35% (8 Wochen) bzw. 34% (16 Wochen), während der in Leber und Muskel gespeicherte Anteil in beiden Altersgruppen jeweils nur etwa 24% betrug. Aus diesen Daten kann gefolgert werden, dass das Alter bei den schlanken Tieren keinen Einfluss auf den Glukosestoffwechsel hat.

Ein ganz anderes Bild ergab sich bei den obesen Tieren (Abb. III-34, III-61).

Bei den 16 Wochen alten ZDF-Ratten zeigte sich signifikant die Bedeutung der Muskulatur, die als Folge der Insulinresistenz nur noch etwa 2% der Glukoselast aufnahm, während bei den 8 Wochen alten Tieren noch annähernd ein Fünftel der Glukose in die Muskulatur floss.

Offenbar ist die Insulinresistenz bei den 8 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten noch nicht so stark ausgeprägt und/oder die Hyperinsulinämie vermag diese noch zu kompensieren (Beha, 2004).

Erstaunlich ist auch der unterschiedliche Leberstoffwechsel der schlanken und obesen Tiere. Bei den schlanken Tieren kommt der Leber im Vergleich zu den obesen Ratten eine eher untergeordnete Bedeutung im nicht-oxidativen Glukosestoffwechsel zu.

Bei den obesen Ratten spielt der Masseneffekt der Blutglukose eine wichtige Rolle, da auch durch eine Hyperglykämie per se die hepatische Glukoseaufnahme gesteigert wird (De Fronzo et al., 1983).

Offensichtlich arbeitet der GLUT-2 Transporter, der insulinunabhängig Glukose entsprechend den Konzentrationsänderungen im Pfortaderblut in die Leber aufnimmt, bei großen Schwankungen der Blutglukosekonzentration effektiver als bei geringen. Eine mögliche Ursache liegt in der hohen Michaeliskonstanten für die Glukose (42 mmol/l) (Löffler u. Petrides, 1997). Da die Leber, ähnlich wie die β -Zellen, eine sehr aktive Glukokinase besitzt, wird von ihr Glukose proportional dem Glukoseangebot der extrazellulären Flüssigkeit metabolisiert (Löffler u. Petrides, 1997).

Bei einem oGTT mit einer Glukosedosis von 4 g/kg KM mit männlichen Sprague-Dawley Ratten wurde über höhere Leberglykogenmengen (20% der applizierten Glukosemenge) berichtet (Niewoehner et al., 1984).

Die Ergebnisse in der Bilanzierung des Leberglykogens in der Ratte sind somit konträr zu den Daten aus Humanstudien. Diese zeigen, dass bei gesunden Patienten ca. 28% einer oralen Glukoselast von der Leber aufgenommen werden bzw. die hepatische Glukoseaufnahme im Typ 2 Diabetes gestört ist (Iozzo et al., 2003).

Hinsichtlich des Leberglykogenstoffwechsels unterscheidet sich die Ratte jedoch per se vom Menschen. Bei der Ratte wird angenommen, dass im Gegensatz zum Menschen der Hauptteil der Glykogensynthese nach einer Glukosebelastung über den indirekten (glukoneogenetischen) Stoffwechselweg erfolgt und demnach die Leber im initialen Glukosestoffwechsel eine untergeordnete Rolle spielt (Newgard et al., 1983).

Aufgrund der massiven Hyperglykämie verloren die diabetischen Tiere zusätzlich 2% der applizierten Glukose über den Urin.

Eine Frage, die weiterhin offen bleibt, ist das Schicksal der Glukose, die nicht bilanziert werden konnte. Die Berechnungen des Anteils der Glukose, der oxidativ verstoffwechselt wurde, kann als hinreichend verlässlich angenommen werden, da über die indirekte Kalorimetrie die Ganzkörperglukoseoxidation erfasst wird. Die Differenz dieser Rechnung betrifft somit nur den nicht-oxidativen Glukosestoffwechsel. Die Kalkulation geht davon aus, dass die absorbierte Glukosemenge der Applizierten entspricht. Der nicht absorbierte, über die Darmflora verstoffwechselte Anteil wird als vernachlässigbar gering angesehen (Abumrad et al., 1982). Ein weiterer Anteil, der nicht erfasst wurde, ist die Aufnahme in die Nieren (Glykogen), das Fettgewebe, in den Magen-Darmtrakt und die in der Zirkulation verbleibende Glukose. Schätzt man ausgehend von der Körpermasse den extrazellulären Verteilungsraum für die Glukose (Meyer et al., 1980), so beträgt dieser sogenannte „glucose space“ bei den diabetischen ZDF-Ratten ca. 8% der applizierten Glukosemenge.

IV.2 Biochemische Parameter

Ziel der biochemischen Analysen war es, die unterschiedlichen Mechanismen in der Regulation des PDH-Enzymkomplexes im Tiermodell der ZDF-Ratte bzw. die Unterschiede zwischen schlanken und obesen Tieren zu untersuchen. Diese Daten sollten dazu beitragen, die in den in vivo Studien gesammelten Ergebnisse im Kontext der Glukoseoxidation zu betrachten und besser interpretieren zu können.

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Untersuchung der PDH-Aktivität (Kap. III.2.4.3.a; III.3.4.3.a) und der PDK4 (Kap. III.2.4.3.b; III.3.4.3.b) unter gefütterten und gehungerten Bedingungen und im Anschluss nach oraler Glukosebelastung diskutiert.

Die PDH-Aktivität erniedrigte sich nach der Nahrungskarenz signifikant bei den 8 und 16 Wochen alten, schlanken und obesen ZDF-Ratten in Leber und Muskel (Abb. III-35, III-62). Die Abnahme der Enzymaktivität korrelierte mit den erhöhten PDK4-Proteinspiegeln (Abb. III-38, III-65). Die Änderung der PDH-Aktivität von der gefütterten zur gehungerten Stoffwechsellage ist konsistent mit den in der Literatur beschriebenen Hungerstudien (Sugden et al., 2000, Holness et al., 2003). Die PDK4-Proteinmenge- und Enzymaktivität ist im Hungerzustand in diesen Geweben erhöht (Wu et al., 1999). Die PDK phosphorylieren die E1 α Untereinheit des PDH-Enzymkomplexes und hemmen somit die PDH-Aktivität (Patel u. Korotchkina, 2003).

Die spezifische PDH-Aktivität beider Gewebe lag für schlanke und obese Tiere unter den o.g. Bedingungen auf vergleichbarem Niveau.

Interessanterweise war jedoch die totale PDH-Aktivität der obesen Ratten erhöht, eine Ausnahme bildete die PDH im Muskel der 8 Wochen alten Tiere. Aufgrund dieser höheren totalen PDH-Aktivität sank somit auch der Anteil aktiver PDH in diesen Geweben, so dass sich bei Betrachtung der prozentualen Werte die 16 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten signifikant von den schlanken Tieren unterschieden (Abb. III-63). Diese Beobachtung unterstreicht, wie wichtig es für das Verständnis der Enzymaktivität ist, sowohl die spezifische als auch die relative Aktivität zu bestimmen.

Bei den PDK4-Proteinspiegeln (Abb. III-38, 65) konnte die in der Literatur beschriebene Regulation zwischen gefüttert und gehungert bestätigt werden. Eine Ausnahme bildete die PDK4 in der Leber der 16 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten.

Während bei den 8 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten eine Erhöhung der PDK4-Proteinmenge vom gefütterten in den gehungerten Zustand festzustellen war, fand bei den 16 Wochen alten, obesen Tieren keine weitere Regulation mehr statt. Möglicherweise lag diese Proteinmenge im oberen physiologischen Grenzbereich. Obwohl die PDK4-Spiegel bei den diabetischen ZDF-Ratten nach dem Hungern unverändert blieben, war die PDH-Aktivität unter gehungerten Bedingungen erniedrigt (Abb. III-62). Um die Frage zu klären, welcher Mechanismus in diesem Fall zur Inaktivierung der PDH führte, wurde ergänzend zur PDK4 auch die PDK2 (Kap. III.3.4.3.c; Abb. III-67) bestimmt. Diese Isoform erhöhte sich in der o.g. Gruppe nach dem Fasten und könnte somit für die Aktivitätsminderung verantwortlich sein.

Die Versuchsergebnisse demonstrieren, dass im Hunger und im diabetischen Tiermodell der ZDF-Ratten eine zur PDK4 analoge Regulation der PDK2 erfolgte, während dies für gehungerte Ratten bzw. Streptozotocin-induziert, diabetische Ratten bisher nicht gezeigt werden konnte (Sugden et al., 2000).

Diese Daten stützen die Theorie von Bajatto et al. (2004). Diese Forschergruppe stellte bei spontan diabetischen „Otsuka Long Evans Tokushima Fatty“-Ratten erhöhte PDK2 Proteinmengen fest im Vergleich zur nicht diabetischen Kontrolle und folgerte daher für die PDK2 eine additive Funktion zur PDK4.

Eine weitere Beobachtung bei der Gewebeanalyse der diabetischen Tiere war die erhöhte Expression der E1 α / β Untereinheit (Kap. III.3.4.3.d: Abb.: III-68) des PDH-Enzymkomplexes. Möglicherweise war die gesteigerte totale Aktivität der obesen Tiere durch die erhöhte Expression dieser Untereinheit bedingt.

Eine positive Korrelation zwischen erhöhter totaler PDH-Aktivität und E1 α / β Enzymmenge wurde auch in Rattenstudien von Da Silva et al. gezeigt (1993). Nach einer Saccharose-reichen, fettfreien Diät erhöhte sich die totale PDH-Aktivität um das Dreifache und die PDH-E1 α Proteinspiegel zwei- bis dreifach im Vergleich zu normal gefütterten Ratten. Die Genexpression der PDH unterliegt wahrscheinlich dem Hormon- und Ernährungszustand (Tan et al., 1998).

In diesem Zusammenhang kommt die Frage nach der Bedeutung dieser Regulation auf.

Die Erhöhung der Proteinspiegel könnte ein Schutzmechanismus vor multipler Phosphorylierung der Serinreste durch die erhöhten PDK-Proteinmengen sein bzw. einen Adaptionsversuch an ein verringertes intrazelluläres Glukoseangebot

darstellen. Vielleicht bedingt dieser Mechanismus auch die geringen Unterschiede in der spezifischen Aktivität zwischen schlanken und obesen Tieren. Hier wäre zu klären, ob E2 und E3 ebenfalls von dieser Regulation betroffen sind, da alle Untereinheiten in einem konstanten Verhältnis vorliegen (Harris et al., 2001).

Vergleicht man die spezifische PDH-Aktivität in Leber und Muskel miteinander, so ist diese im Muskelgewebe höher.

Die Totalaktivität der PDH in Leber und Muskel bezogen auf das zelluläre Geamtprotein ist gleich. Muskelzellen jedoch enthalten mehr Mitochondrien, daher würde man erwarten, dass die spezifische PDH-Aktivität bezogen auf das mitochondriale Protein im Muskel niedriger ist. Um direkt die PDH-Aktivität von Leber und Muskel vergleichen zu können, müsste man diese aus einer Mitochondrienanreicherung bestimmen.

Neben den basalen Regulationsmechanismen wurden die akuten biochemischen Veränderungen bei einer plötzlichen Umstellung des Stoffwechsels von gehungert auf „gefüttert“, die durch einen oGTT simuliert wurden, untersucht.

Nach der Glukosebelastung stieg die Aktivität der PDH bei schlanken und obesen Ratten unmittelbar an (Abb. III-37, III-64).

Somit scheint eine Änderung der PDH-Aktivität direkt nach einer Glukosegabe ohne Verzögerung auftreten zu können. Vergleichbare Experimente sind Wiederanfütterungsstudien gehungerter Ratten nach unterschiedlich langer Nahrungskarenz (Holness et al., 1988; Holness u. Sugden, 1989; Holness u. Sugden, 1989). Allerdings konnte in diesen Versuchen eine Reaktivierung der PDH nur nach einer Hysteresis-Zeitspanne von mehreren Stunden festgestellt werden.

Insgesamt war die PDH-Aktivität zwischen schlanken und obesen Tieren auf ähnlichem Niveau (Abb. III-37, III-64). Dieses korreliert direkt mit den RQ Werten und der KHO, als Parameter für den oxidativen Glukosestoffwechsel. Nach Erreichen des Aktivitätsmaximums der PDH war zeitgleich die höchste KHO (Abb. III-17, III-44) zu messen. Aus diesen Daten kann gefolgert werden, dass die gesteigerte KHO mit der Reaktivierung der PDH gekoppelt zu sein scheint und diese ihrerseits von der Rate des glykolytischen Flusses abhängt.

Erwähnenswert ist hierbei, dass die PDH-Aktivität nach Glukosebelastung bei höheren Werten lag als unter Fütterung. Dieses könnte dahingehend interpretiert

werden, das der Organismus bei einem plötzlich anflutenden hohen Substratangebot durch Steigerung der Effektivität der PDH die Umsatzrate erhöht. Im gefütterten Zustand ist der Komplex dagegen nur zu etwa 15-40% aktiv (Morrell et al., 2003).

Ein überraschendes Resultat ergab sich bei der Bestimmung der PDK4-Proteinspiegel (Abb. III-39, III-66) während des oGTT. Die PDK4-Proteinmenge nahm, mit Ausnahme der Leber der obesen Ratten, bei allen Tieren während des oGTT ab. Spätestens zwei Stunden nach Glukosegabe waren die PDK4-Proteinspiegel signifikant in beiden Geweben erniedrigt.

Eine Abnahme der Expression der PDK4 nach einer 4-5 stündigen Wiederanfütterung gehungerter Wistar Ratten mit einer normalen Rattendiät (48 h bzw. über Nacht gehungert) wurde bereits berichtet (Lee et al., 2004, Sugden et al., 2000). Allerdings wurde dort im Vergleich zu der vorliegenden Studie kein solch rascher Proteinabbau festgestellt. Mögliche Gründe dafür könnten sein, dass im Rahmen dieser Arbeit eine akute „Glukosefütterung“ bzw. eine kürzere Nahrungskarenz gewählt wurde.

Änderungen der PDK4 auf Proteinebene werden als Langzeitregulation bezeichnet (Patel u. Korotchkina, 2003). Der Zeitrahmen, in dem sich die Änderung der PDK4 Enzymmenge ereignete, spricht für eine weitere Möglichkeit der Kurzzeitregulation, um den PDH-Komplex schnell und effektiv an einen akut geänderten Substratfluss anzupassen bzw. den Durchsatz durch diesen Stoffwechselweg zu steigern.

Der für diesen Mechanismus notwendige Stimulus könnte Insulin sein, da nach dem Anfluten der Glukose im Blut sofort die Insulinausschüttung erfolgt. Für die schlanken Tiere konnte ein deutlicher Anstieg unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht beobachtet werden (Abb. III-19, III-46). Da die Insulinsekretion biphasisch verläuft (Aizawa et al., 2002), könnte der 1. Gipfel, der normalerweise nur in den ersten 15 Minuten nach einem Glukosestimulus zu beobachten ist, der Bestimmung entgangen sein, da die erste Messung erst nach 30 Minuten erfolgte.

Um diese Hypothese zu bestätigen, könnte in zukünftigen Versuchen gehungerten Ratten Insulin in unterschiedlicher Dosierung verabreicht und zu definierten Zeitpunkten die PDK4-Proteinmenge und die PDH-Aktivität bestimmt werden.

Ergebnisse eines ähnlichen Experiments stützen diese Annahme. So wurde gezeigt, dass die PDK4-Proteinmenge und mRNA im Wadenmuskel diabetischer Ratten nach Insulinapplikation annähernd der PDK4-Protein- und mRNA Menge gefütterter Kontrolltiere entsprach (Wu et al., 1999). Die Insulinapplikation bewirkte eine ca. 5-fache Abnahme der PDK4-Proteinspiegel.

Proteindegradation ist ein wichtiger Mechanismus der Zelle, um sich an wechselnde Umweltverhältnisse anzupassen. Viele Enzyme, die an Schlüsselpositionen des Stoffwechsels angesiedelt sind, unterliegen einem raschen „Turnover“ (Lehninger et al., 1993), der die Regulation der Enzymaktivität durch Abbau und Neusynthese ermöglicht.

Der proteolytische Abbau auf Transkriptionsebene wurde bereits in vitro in Myotuben untersucht. So wurde gezeigt, dass bei einer 5-stündigen Inkubation mit Insulin die mRNA um den Faktor 2,1 (PDK2) bzw. um den Faktor 2,6 (PDK4) abnahm. Die Regulation erfolgt dabei über den Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase abhängigen Signalweg (Abbot et al., 2005).

Ein möglicher Abbauweg auf Translationsebene wäre die für die Proteindegradation bekannte Ubiquitin-kontrollierte Proteolyse (Karlson et al., 1994).

Der energieverbrauchende Mechanismus des proteolytischen Abbaus der PDK4 unterstreicht die Bedeutung der Glukose als bevorzugtes Substrat zur Energiegewinnung. Dies ist konsistent mit einem wichtigen physiologischen Konzept, nämlich dass der effizienteste Weg ATP unter Sauerstoffverbrauch zu produzieren, die Glukoseoxidation ist, während die Fettoxidation ein aufwendigerer Prozess ist, was den Sauerstoffverbrauch betrifft (Ferrannini, 1988).

Schlussfolgerungen aus den in vivo und ex vivo Analysen

Aus den Ergebnissen der in vivo und ex vivo Analysen kann geschlossen werden, dass weder die insulinresistente noch die diabetische, obese ZDF-Ratte einen Defekt in der Glukoseoxidation besitzt. Diese Daten sind somit konträr zu den am Menschen durchgeführten Studien (Thorburn et al., 1990).

Die ZDF-Ratte ist folglich ein brauchbares Tiermodell zur Simulierung des humanen Typ 2 Diabetes, unterscheidet sich jedoch hinsichtlich der Pathophysiologie des oxidativen Glukosestoffwechsels.

Die sogenannte „metabolische Inflexibilität“ (Kelley u. Mandarino, 2000), d.h. die unzureichende Kapazität diabetischer oder obeses Probanden, von Fett- auf Kohlenhydratoxidation umzuschalten, trifft nicht für das Tiermodell der ZDF-Ratte zu.

Vielmehr könnte der Defekt bei diesem Tiermodell in der Fettoxidation liegen. So konnten bei Hungerstudien (Nahrungskarenz bis 72 Stunden) mit 8 und 16 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten im Vergleich zu schlanken Kontrolltieren eine signifikant protrahierte Ketonkörperproduktion gezeigt werden (Beha, 2004), was für eine verzögerte β -Oxidation spricht.

Diese „Trägheit“ der obesen Tiere spiegelte sich auch im Verlauf der FO nach Nahrungsentzug (Abb. III-78, B: Kontrolle) wider. Während die KHO bei Nahrungskarenz zwischen schlanken und obesen Tieren ähnlich verlief, war der Anstieg in der FO und somit das Umschalten auf Fettstoffwechsel sehr verzögert.

Weitere Hinweise für einen ungestörten oxidativen Glukosemetabolismus ergaben Studien der indirekten Kalorimetrie mit obesen, diabetischen ZDF-Ratten, die unter thermoneutralen Bedingungen gehungert wurden (Daten nicht gezeigt). Diese Versuche zeigten, dass die Tiere trotz einer Nahrungskarenz von 18 Stunden einen sehr langsamen Abfall in der KHO aufwiesen. Die Tiere wurden bei „normalen“ Haltungsbedingungen zur Fettoxidation gezwungen, um über verstärkte Thermogenese das entstehende Energiedefizit zu kompensieren. Durch dieses Temperaturmanagement nehmen die Tiere verstärkt Nahrung auf (Hyperphagie) und entwickeln so ihr charakteristisches viszerale Fettdepot, während sich unter thermoneutraler Haltung ein manifester Diabetes gar nicht entwickelt. Der Abstand zur thermoindifferenten Zone ist sozusagen der Stimulus für eine verstärkte Lipolyse mit folgender ektopischer Fettablagerung in den pankreatischen β -Zellen.

Nach diesen Ergebnissen ist die Ursache für die verminderte Glukoseoxidation in Relation zum Angebot der zirkulierenden Glukose, zumindest für dieses diabetische Tiermodell, weniger ein Defekt im oxidativen Glukosestoffwechsel als vielmehr die Konsequenz des reduzierten Glukosetransports in die Zelle. Das bedeutet, es besteht ein Missverhältnis zwischen der intrazellulären Glukoseversorgung und dem Oxidationsvermögen als Folge der Insulinresistenz (Kap. III.2.4.1.a; Kap. III.3.4.1.a). Wird der Zelle ein ausreichend hohes Substratangebot zur Verfügung gestellt, wie im Rahmen dieser Arbeit durch die über die orale Glukosebelastung bedingte Hyperglykämie (Kap. III.2.1; Kap. III.3.1), funktioniert der oxidative Glukosestoffwechsel normal (Kap. III.2.2; Kap. III.3.2).

IV.3 Pharmakologische Studien mit DCA

Die erste DCA-Studie wurde an insulinsensitiven, schlanken sowie an diabetischen, obesen ZDF-Ratten durchgeführt (Kap. III.4.1). Dieser Versuch sollte prüfen, ob durch die Behandlung mit einem PDK-Inhibitor eine Steigerung der PDH-Aktivität möglich ist bzw. das Gleichgewicht zwischen FO und KHO in der Hungerstoffwechsellage zugunsten der Glukoseoxidation verschoben werden kann.

Für schlanke und obese ZDF-Ratten konnte gezeigt werden, dass die Senkung der Blutglukose auf den Wirkmechanismus einer gesteigerten PDH-Aktivität zurückzuführen ist. Jedoch zeigten schlanke und obese Tiere unter der Behandlung ein unterschiedliches Muster.

Bei den insulinsensitiven Ratten sank zwei Stunden nach der ersten Applikation (DCA 1x: Abb. III-69, A) die Blutglukose, während bei den obesen Tieren innerhalb der ersten vier Stunden (Abb. III-69, B), trotz gesteigerter PDH-Aktivität (Abb. III-73) keine Reaktion auf die Behandlung zu beobachten war. Anders verhielt es sich bei Laktat (Abb. III-70); unmittelbar nach Applikation des PDK-Inhibitors fielen die Laktatwerte sowohl in der schlanken als auch in der obesen Gruppe im Vergleich zur Kontrolle signifikant ab. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint Laktat für ein in vivo Monitoring der PDH, bezüglich unmittelbarer Aktivitätsänderungen in einem kurzen Versuchszeitraum, der sensiblere Blutparameter zu sein.

Da bei der zweimaligen Applikation (DCA 2x) die Substanz bereits am Vortag gegeben wurde, lagen die Blutglukose- und Laktatwerte jeweils bei einem tieferen Wert. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Inaktivierung der PDH, um nach dem Nahrungsentzug Glukose zu sparen, bis zu einem gewissen Grad verhindert werden konnte.

Des Weiteren kann aus den Daten gefolgert werden, dass die Wirkung des Inhibitors über mindestens 18 Stunden anhielt.

Bei den jeweils zweimal behandelten Gruppen konnte die zweite DCA Gabe keine weitere Blutglukosesenkung herbeiführen bzw. Laktat nur noch in geringem Maße senken. Möglicherweise ist nach der ersten Behandlung der pharmakologische Effekt auf die PDH Aktivität nicht mehr weiter zu steigern.

Die Ergebnisse der Glykogenbestimmungen (Abb. III-71, 72) zeigen den Zusammenhang zwischen der gesteigerten PDH-Aktivität und der Abnahme der Glykogenvorräte. Diese Abnahme konnte in der Leber und im Muskel der obesen ZDF-Ratten beobachtet werden und war abhängig von der Anzahl der Applikationen.

Unter DCA Behandlung konnte bereits nach einer einmaligen Dosis die Enzymaktivität im Leber- und Muskelgewebe (Abb. III-73) in etwa verdoppelt werden. Bezeichnet man den prozentualen Anteil nicht aktiver PDH in den Geweben der Kontrolle als sogenanntes therapeutisches Fenster, so war nach der pharmakologischen Intervention noch ein Spielraum von etwa 20% (Muskel) bzw. 50% (Leber) für eine weitere Aktivitätssteigerung zum theoretisch möglichen Wert von 100% vorhanden (Abb. III-74). Die begrenzte Steigerung der PDH-Aktivität, insbesondere in der Leber, ist möglicherweise Ausdruck der Unspezifität von DCA als PDK-Inhibitor. Weitere Steigerungen wären durch spezifische Inhibitoren möglich (Mayers et al., 2005), wobei eine vollständige Dephosphorylierung aufgrund der vielfältigen Interkonvertierung des Enzymkomplexes nur als theoretisches Maximum angesehen werden kann.

Da bei der obesen Gruppe nach einmaliger Gabe von DCA kein Blutglukoseabfall festzustellen war, obwohl die sinkenden Laktatspiegel eine PDH-Aktivierung vermuten ließen und diese auch bestätigt werden konnte, wurde der Versuchszeitraum auf 8 Stunden ausgedehnt, um diesen Sachverhalt zu eruieren.

Auch bei dieser Studie (Kap. III.4.2) wiederholte sich die zuvor beschriebene Situation. Durch die Behandlung sank bei den insulin sensitiven Wistar Ratten unmittelbar nach Applikation die Blutglukose ab, während bei den obesen ZDF-Ratten erst gegen Ende des Versuchs ein deutlicher Abfall der Blutglukose beobachtet werden konnte (Abb. III-75), obwohl der RQ (Abb. III-76) und die Daten der KHO (Abb. III-77) bereits nach Applikation für eine gesteigerte Glukoseoxidation sprachen. Dieser Umstand könnte mit der Pathophysiologie des Leberglukosestoffwechsels der obesen ZDF-Ratten erklärt werden. Bei diesen Tieren enthielt die Leber nach dem Hungern rund 1 g Glykogen, bei den schlanken Tieren waren die Leberglykogenvorräte nach der Nahrungskarenz jedoch mit rund 2 mg annähernd aufgebraucht (Abb. III-82). Die obesen Tiere hatten somit nach dem Fasten immer noch genug Glykogen in der Leber gespeichert, das über die Glykogenolyse freigesetzt werden konnte, um einem Abfall der Blutglukose infolge gesteigerter Glukoseoxidation entgegenzuwirken. Erst als diese Reserve zur Neige ging, begann sich ein Abfall in der Blutglukose (Abb. III-75, B) bemerkbar zu machen. Interessanterweise entspricht auch die Differenz in der KHO zwischen der Kontrolle und den behandelten obesen ZDF-Ratten in etwa dem Unterschied im Leberglykogen dieser Tiere. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der hohe Leberglykogenvorrat der obesen ZDF-Ratten den protrahierten Abfall der Blutglukose bedingte. Die schlanken Tiere verfügen nicht über einen solchen Stoffwechselweg, da keine Glykogenreserven mobilisiert werden können, um die erhöhte Glukoseoxidation zu kompensieren. Bei ihnen spiegelt sich folglich eine erhöhte Glukoseoxidation direkt im Verlauf der Blutglukose wider.

Die Veränderungen im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel nach Behandlung mit DCA konnten durch die Darstellung der KHO (Abb. III-77) und der FO (Abb. III-78) gezeigt werden. Unmittelbar nach der Applikation erhöhte sich in beiden Gruppen die KHO, umgekehrt fiel die FO ab.

Anhand dieser Daten konnte deutlich demonstriert werden, dass PDK-Inhibitoren den Stoffwechsel mit vermehrter Fettoxidation auf erhöhte Glukoseoxidation umstellen können. Der Zusammenhang zwischen Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel wird deutlich, wenn die KHO und die FO in einer Graphik dargestellt werden (Abb. III-79).

Durch die kontinuierlich abfallende KHO nach dem Nahrungsentzug bzw. die stetig zunehmende FO ergab sich ein scherenartiger Verlauf. Der „Raum“ zwischen

diesen beiden Kurven reflektiert damit das therapeutische Fenster. Eine PDK Inhibition hebt den unteren Schenkel (KHO) und senkt den oberen (FO) (Abb. III-79, C/D), so dass die beiden Kurven im günstigsten Fall parallel verlaufen oder sich erneut kreuzen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Messung der KHO zusammen mit der FO zur Untersuchung der PDH-Aktivität im Hinblick auf eine pharmakologische Aktivierung ein geeigneter Parameter ist, um schnelle Stoffwechseländerungen aufzuzeigen und den Zusammenhang zwischen der Kohlenhydrat- und Lipidoxidation zu verdeutlichen. Diese Methode hat unter tierexperimentellen Gesichtspunkten weiterhin den Vorteil, dass die Analyse nicht-invasiv erfolgt, nicht zu stressbedingten (manipulationsbedingten) Schwankungen im Blutglukoseverlauf führt und Stoffwechselveränderungen über einen langen Versuchszeitraum aufgedeckt werden können.

Die Tatsache, dass sich die pharmakologisch bedingten Änderungen in der Aktivität der PDH in der Atemgasanalyse sehr schnell bemerkbar machten, zeigt, dass die Hemmung der PDK ohne Latenzphase erfolgte. Diese in der Atemgasanalyse schnell feststellbaren Aktivitätsänderungen stützen die Bedeutung der indirekten Kalorimetrie als in vivo Methode zum Studium der PDH.

Die Versuchsergebnisse veranschaulichen, dass gehungerte ZDF-Ratten ein geeignetes Modell für das Studium einer akuten Wirkung von PDK-Inhibitoren sind.

Die Daten demonstrieren auch, dass sich obese ZDF-Ratten aufgrund ihrer Pathophysiologie völlig anders im Hinblick auf den Leberstoffwechsel verhalten als schlanke ZDF-Ratten. Somit könnte die gehungerte Wistar Ratte oder die schlanke ZDF-Ratte als Tiermodell für Studien mit kurzer Versuchsdauer herangezogen werden, während die gefütterte, obese ZDF-Ratte eher für Langzeitstudien geeignet wäre.

Sowohl die oGTT Studien als auch die pharmakologischen Studien unterstreichen anhand der schnellen Änderungen im Gleichgewicht zwischen der KHO und der FO erneut die Bedeutung des PDH-Komplexes als Schlüsselenzym der Blutglukosehomöostase.

IV.4 Ausblick

Die Bedeutung und der quantitative Beitrag des Glukosemetabolismus über den Pentosephosphatweg und durch die Kombination von Glykolyse und Citratzyklus müsste in Studien mit radioaktiven Substraten genauer erforscht werden. Hierzu könnte man einem Tierkollektiv Glukose applizieren, die an C-1 markiert (1- ^{14}C -Glukose) ist, einem anderen Glukose, die die ^{14}C -Markierung am C-6 trägt und über die Menge des ausgeatmeten $^{14}\text{CO}_2$ die jeweilige Oxidationsrate abschätzen. Hinter diesem Experiment steht die Überlegung, dass im Pentosephosphatweg nur das C-1 durch Decarboxylierung entfernt wird, wohingegen C-1 und C-6 im gleichen Ausmaß als CO_2 abgespalten werden, wenn die Glukose durch die Glykolyse, den PDH-Komplex und den Citratzyklus metabolisiert wird (Stryer, 1988).

Der RQ und somit auch die KHO spiegelt den Ganzkörperkohlenhydratumsatz wider. Es wäre hier sicher interessant, den Glukoseumsatz mit und ohne enteraler Resorption zu untersuchen. Um die Aufnahme aus dem Darm zu umgehen, könnte man den oxidativen Stoffwechsel in einem intravenösen oder intraperitonealen Glukosetoleranztest untersuchen und mit einem oGTT vergleichen.

Sowohl die Wistar Ratte als auch die ZDF-Ratte sind als Tiermodelle zum Studium der PDK Inhibition geeignet, jedoch muss bei der Interpretation der Versuchsergebnisse die Besonderheit im Leberstoffwechsel der obesen ZDF-Ratten berücksichtigt werden. Zur Validierung von PDK-Inhibitoren eignet sich die indirekte Kalorimetrie als wertvolle, nicht-invasive in vivo Methode.

Die pharmakologischen Studien zeigen einen kausalen Zusammenhang zwischen gesteigerter PDH-Aktivität und erhöhter Glukoseoxidation. PDK-Inhibitoren könnten somit eine interessante Perspektive bieten, um die diabetische Blutglukosehomöostase zu verbessern.

Jedoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Hyperglykämie nur eine Dekompensation im komplexen Stoffwechsel des Typ 2 Diabetes darstellt und dass pharmakologische Eingriffe im Glukosestoffwechsel wiederum andere biochemische Pfade beeinflussen können, wie zum Beispiel den Lipidmetabolismus.

Sowohl die in dieser Arbeit durchgeführten pharmakologischen Experimente als auch die in der Literatur beschriebenen Versuche (Mayers et al., 2005, Mayers et al., 2003, Wells et al., 1980) waren allesamt Akutstudien. Um die längerfristige Wirkung von PDK-Inhibitoren auf den gesamten Stoffwechsel zu untersuchen,

müssen in Zukunft chronische Studien durchgeführt werden, um weitere wichtige Fragen im Kontext der Pathophysiologie des Typ 2 Diabetes zu klären.

Eine interessante Frage ist, ob durch PDK-Inhibitoren der Anteil glykosylierter Proteine gesenkt werden kann und somit das Risiko für diabetische Angiopathien.

Wie das bei einem erhöhten Substratfluss durch die PDH vermehrt anfallende Acetyl-CoA letztendlich verstoffwechselt wird, muß noch erforscht werden.

Die Acetylgruppe könnte im Citratzyklus vollständig zu CO₂ oxidiert werden, zur Ketonkörperproduktion oder für die Fettsäurensynthese genutzt werden (Stryer, 1988). Der zuletzt genannte Stoffwechselweg könnte im Fettgewebe zu einer Zunahme der Fettdepots führen und somit eine Obesitasentwicklung fördern. In Leber- und Muskelgewebe könnte dieser Mechanismus zu einer Ablagerung von hepatozellulärem und intramyozellulärem Lipid führen. Die viszerale (Kahn u. Flier, 2000) und die ektopische Fettspeicherung (Kuhlmann et al., 2003) würden ihrerseits wiederum die Insulinsensitivität negativ beeinflussen.

Für längerfristige Studien müssen somit zusätzliche Parameter ermittelt werden: Kontrolle der Körpermasse, Bestimmung der Ketonkörper, des Glykohämoglobin-Wertes (HbA1c), von Malonyl-CoA (Leber, Muskel) und Messung von intramyo- und hepatozellulärem Lipid mittels Magnetresonanztomographie. Zur Untersuchung der Insulinsensitivität wären Clamp-Studien die Methode der Wahl.

Bei einer euglykämischen Clamp-Studie bei Ratten konnte gezeigt werden, dass eine intrahypothalamische Infusion von DCA einen Abfall der Blutglukose bewirkte (Lam et al., 2005). Die erhöhte Glukoseinfusionsrate beruhte auf einer Senkung der hepatischen Glukoseproduktion, nicht jedoch auf einer gesteigerten Glukoseoxidation (Lam et al., 2005).

Eine zentrale Aktivierung der PDH hätte demnach den Vorteil, dass eine Behandlung nicht zu einer Zunahme der Fettmasse führen würde.

V Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit ist das Studium der Blutglukosehomöostase und die Regulation des PDH-Komplexes in der Ratte.

Als Tiermodelle wurden die Wistar Ratte und die ZDF-Ratte, ein genetisches Tiermodell für die spontane Entwicklung des Typ 2 Diabetes, gewählt.

Die Glukoseoxidation spielt eine entscheidende Rolle im Energiestoffwechsel. Der PDH-Komplex verbindet die Glykolyse mit dem Zitronensäure-Zyklus und fungiert als Schlüsselenzym im oxidativen Glukosemetabolismus. Hungerzustand und Diabetes verursachen einen Anstieg der PDK4-Expression in mehreren Geweben. Der Anstieg der PDK4-Proteinmenge ist nach einer Nahrungskarenz sehr wichtig, um die PDH-Aktivität zu senken und damit eine Hypoglykämie zu vermeiden. Im Diabetes jedoch ist diese Regulation nachteilig, da die Erhaltung glukoneogenetischer Substrate zur Hyperglykämie beiträgt.

Anhand eines oGTT (2 g/kg KM) wurden bei insulin sensitiven, insulinresistenten und diabetischen Tieren die Anteile des oxidativen und nicht-oxidativen Glukosestoffwechsels bilanziert. Zur Untersuchung der Glukoseoxidation wurde als Methode die indirekte Kalorimetrie gewählt. Der prozentuale Anteil der KHO an der applizierten Glukosemenge betrug bei den 8 Wochen alten ZDF-Ratten 35% (45% obese) und bei dem 16 Wochen alten Kollektiv jeweils 34%. Der nicht-oxidative Fluss der Glukose in Leber und Muskel wurde über die Bestimmung von Glykogen und freier Glukose quantifiziert. Die Studien demonstrierten, dass die (Patho)physiologie im Leberstoffwechsel sowohl der schlanken als auch der obesen ZDF-Ratten nicht auf die Situation beim Mensch projiziert werden kann. Während bei schlanken Tieren die hepatische Glukoseaufnahme bei einer oralen Glukosebelastung eine minore Rolle spielte, speicherte die Leber der diabetischen Tiere paradoxerweise beträchtliche Mengen an Glykogen. In der Leber der 8 und 16 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten wurden von der applizierten Glukosemenge 18% bzw. 25% als Glykogen gespeichert; bei den schlanken Tieren betrug dieser Anteil nur 1% bzw. 2%. Der als Muskelglykogen gespeicherte Anteil ergab bei den 8 Wochen alten Tieren 21% (schlank) bzw. 18% (obese) und bei den 16 Wochen alten Ratten 16% (schlank) bzw. 26% (obese).

Zur Untersuchung der Regulation des PDH-Komplexes im Leber- und Muskelgewebe wurde ex vivo die PDK4, PDK2 und PDH-E1 α/β Proteinmenge mittels

Western-Blot-Analyse bestimmt und die PDH-Aktivität über die Produktion von $^{14}\text{CO}_2$ aus $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -Pyruvat gemessen. Die Analysen der biochemischen Parameter sollten die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Kurz- und Langzeitregulation des PDH-Komplexes bei der ZDF-Ratte, sowohl in Abhängigkeit der diabetischen Stoffwechsellage als auch nach akut angebotener Glukose aufdecken.

Durch die Versuchsdaten konnte gezeigt werden, dass durch eine orale Glukosebelastung eine Reaktivierung der PDH-Aktivität binnen weniger Minuten möglich ist und dabei kurzfristig die Aktivitätswerte gefütterter Tiere überschritten werden können. Eine Stunde nach der Glukosebelastung war die spezifische PDH-Aktivität bei den 16 Wochen alten Tieren 3,6 (Leber) bzw. 4,6-fach (Muskel) höher als zu Beginn des Versuchs. Während des oGTT war die Änderung der PDH-Aktivität im Leber- und Muskelgewebe zwischen schlanken und obesen ZDF-Ratten nicht signifikant unterschiedlich. Aus den Ergebnissen der in vitro und in vivo Studien konnte somit gezeigt werden, dass weder die prädiabetische noch die manifest diabetische ZDF-Ratte einen Defekt im oxidativen Glukosestoffwechsel besitzt.

Die totale PDH-Aktivität war bei den diabetischen ZDF-Ratten im Vergleich zu den schlanken Tieren signifikant erhöht. Die annähernd doppelt so hohe Proteinexpression von E1 α / β in Leber und Muskel der obesen Tiere deutet darauf hin, dass die gesteigerte totale PDH-Aktivität obeser Tiere auf die erhöhten Proteinspiegel dieser Untereinheiten zurückzuführen ist.

Durch die Western-Blot-Analyse konnte demonstriert werden, dass während des oGTT ein schneller Proteinabbau der PDK4 erfolgte. Die PDK4-Proteinspiegel waren, mit Ausnahme der Leber der obesen Tiere, ab der 2. Stunde nach der Glukosebelastung im Vergleich zu den Werten zu Versuchsbeginn signifikant erniedrigt. Daher muss die Degradation der PDK4 als neuer Mechanismus in der Kurzzeitkontrolle des PDH-Enzymkomplexes diskutiert werden.

Sowohl die Proteinspiegel der PDK4 als auch der PDK2 waren bei den diabetischen ZDF-Ratten im Vergleich zu den schlanken Tieren signifikant erhöht. Die Ergebnisse der Proteinanalyse sprechen für eine additive Funktion der PDK2 zur PDK4, die in der Langzeitkontrolle des PDH-Komplexes als Hauptregulator angesehen wird.

In pharmakologischen Experimenten wurde verdeutlicht, dass die Senkung der Blutglukose auf den Wirkmechanismus einer gesteigerten PDH-Aktivität zurückzuführen ist. Bei den diabetischen ZDF-Ratten bewirkte eine einmalige

Applikation von DCA (500 mg/kg KM) eine Verdopplung der spezifischen PDH-Aktivität in Leber und Muskel. Bei Untersuchungen zur Hemmung der PDK am Tiermodell der ZDF-Ratte ist der Unterschied im Leberstoffwechsel zwischen schlanken und obesen Tieren zu beachten. Trotz einer Nahrungskarenz von 18 Stunden konnten die obesen Tiere über eine Mobilisierung der hohen Leberglykogenreserven (962 ± 121 mg/Leber) einen Blutglukoseabfall bis zu etwa sechs Stunden kompensieren, während bei insulin sensitiven Ratten ein gesteigerter Substratumsatz über die PDH unmittelbar in sinkenden Blutglukosespiegeln resultierte.

Da PDK-Inhibitoren unter hungerähnlichen Stoffwechselbedingungen die Glukoseoxidation erhöhen, könnten diese Substanzen in Zukunft zu einer interessanten Perspektive werden, um die diabetische Blutglukosehomöostase zu verbessern.

Summary

This study investigates the blood glucose homeostasis and the regulation of the PDC in the rat.

The Wistar rat and the ZDF-rat, a genetic model for the spontaneous development of type 2 diabetes, were investigated.

Glucose oxidation plays a major role in energy metabolism. The pyruvate dehydrogenase complex (PDC) links the glycolysis with the citric acid cycle and functions as a key enzyme in the oxidative glucose pathway. Starvation and diabetes cause an increase in PDK4 expression in various tissues. The increase in PDK4 expression is critically important in the starved state to prevent hypoglycemia. However, it is detrimental in diabetes because conservation of gluconeogenic substrates contributes to hyperglycemia.

By means of an oGTT, the proportions of the oxidative and non-oxidative glucose metabolism were calculated in rats with a physiological responsiveness to insulin, in insulin resistant rats and in diabetic ones. Indirect calorimetry was chosen as a method to analyze glucose oxidation. The percentage of CHO in the 8 weeks old ZDF-rats was 35% (45% obese) of the administered glucose and in the 16 weeks old collective 34% in each case. The non-oxidative flux into liver and muscle was quantified by determination of free glucose and glycogen.

The studies showed that the (patho)physiology in liver metabolism, both in lean and in obese ZDF-rats, cannot be transmitted to human subjects. In the diabetic animals the liver paradoxically stored large amounts of glycogen whereas in lean animals hepatic glucose uptake played obviously a minor role when an oral glucose load of 2 g per kg body weight was given. In the livers from the 8 and 16 weeks old obese ZDF-rats 18% and 25% were stored as glycogen, respectively; in the lean animals this share was only 1% and 2%, respectively.

In liver and muscle tissue PDK4, PDK2 and PDC-E1 α/β protein levels were determined by ex vivo western-blot-analysis. PDC activity was measured by production of $^{14}\text{CO}_2$ from [1- ^{14}C]-pyruvate. The analyses of biochemical parameters should reveal the similarities and the differences in short- and long-term regulation of the PDC in the ZDF-rat, both the dependence on the diabetic condition and after an acute supply of glucose.

The data show that PDC activity can be reactivated within few minutes by an oral glucose load even beyond the values of fed animals. One hour after the glucose load, the specific PDC-activity in 16 weeks old rats was 3.6 (liver) and 4.6-times (muscle) higher than before the test. During oGTT the changes in PDC activity in liver and muscle were not significantly different between lean and obese animals. Neither in the prediabetic nor in the overt diabetic ZDF-rat there was a defect in oxidative glucose metabolism indicated by the in vitro and in vivo studies' results.

The total PDC activity was significantly higher in the diabetic rats than in lean ones. Both, E1 α and β protein levels in liver and muscle were elevated approximately twofold in obese animals. These data indicate that the increase of total activity in obese ZDF-rats is due to elevation of PDC E1 α / β protein levels.

The Western blot analysis demonstrates that during the oGTT a rapid protein breakdown happens. With the exception of the liver of the obese animals, PDK4 protein levels were significantly decreased in comparison to the levels at the beginning of the test two hours after glucose administration. Thus, this degradation has to be discussed as a new mechanism in short-term regulation of the PDC. Both PDK4 and PDK2 protein levels were significantly increased in diabetic rats compared to lean animals. The results from the protein analysis argue for an additive function of PDK2 for PDK4, which is considered to be the main regulator in long-term control of PDC in diabetic rats.

In the pharmacological experiments it was shown that the lowering of blood glucose was originated by an increase in PDC activity. In diabetic ZDF-rats a single application of DCA (500 mg/kg) doubled the specific PDC activity in liver and muscle. In experiments of PDK inhibition in ZDF-rats, the difference in liver metabolism between lean and obese animals must be considered. Even after a fasting period of 18 hours, obese animals were able to compensate a decline in blood glucose for about six hours by mobilising its sizeable liver glycogen reserves (962 ± 121 mg/liver), whereas in insulin sensitive rats the outcome of an increased substrate turnover through PDC was an immediate decrease in blood glucose levels.

Because PDK-inhibitors enhance glucose oxidation in starvation-like conditions, they might be an useful perspective to improve diabetic blood glucose homeostasis in future.

VI Literaturverzeichnis

- Abbot EL, McCormack JG, Reynet C, Hassall DG, Buchan KW, Yeaman SJ:** Diverging regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform gene expression in cultured human muscle cells. *FEBS Journal* 2005; 272: 3004-3014
- Abumrad NN, Cherrington AD, Williams PE, Lacy WW, Rabin D:** Absorption and disposition of a glucose load in the conscious dog. *Am J Physiol* 1982; 242: E398-E406
- Aizawa T, Sato Y, Komatsu M:** Importance of nonionic signals for glucose-induced biphasic insulin secretion. *Diabetes* 2002; 51: 96-98
- Bailey CJ:** New drugs for the treatment of diabetes mellitus. In: DeFronzo RA, Ferrannini E, Keen H, Zimmet P: *International Textbook of Diabetes Mellitus*, John Wiley & Sons, 2004; 3. Auflage: 951-979
- Bajatto G, Murakami T, Nagasaki M, Tamura T, Tamura N, Harris RA, Shimomura Y, Sato Y:** Down regulation of the skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat both before and after the onset of diabetes mellitus. *Life Sciences* 2004; 75: 2117-2130
- Beha A:** Muskelfasertypspezifische und hepatische Dynamik des Fettsäurestoffwechsels – eine in vivo ¹H-NMR-spektroskopische Studie zur pharmakologischen Charakterisierung antidiabetisch wirksamer Substanzen. *Inaugural-Dissertation an der JLU Gießen*: 2004
- Bergmann RN, Ader M:** Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 351-356
- Bjorkman O, Eriksson LS, Nyberg B, Wahren J:** Gut exchange of glucose and lactate in basal state and after oral glucose ingestion in postoperative patients. *Diabetes*. 1990; 39: 747-51
- Boden G:** Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997; 45: 3-10
- Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov KM:** Evidence for the existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem J* 1998; 329: 191-196

- Brotman DJ, Girod JP:** The metabolic syndrome: A tug-of-war with no winner. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2002; 69: 990-994
- Buck MJ, Squire TL, Andrews MT:** Coordinate expression of the PDK4 gene: a means of regulating fuel selection in a hibernating mammal. *Physiol Genomics* 2002; 8: 5-13
- Caruso M, Maitan MA, Bifulco G, Miele C, Vigliotta G, Oriente F, Formisano P, Beguinot F:** Activation and mitochondrial translocation of protein kinase C delta are necessary for insulin stimulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in muscle and liver cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 45088-45097
- Cherrington AD:** Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes* 1999; 48: 1198-1214
- Chevaux F, Maeder E, Ravussin E, Jéquier E:** Study by indirect calorimetry of the oxidation rate of carbohydrate in man at two different plasma insulin levels. *Diabetologia* 1976; 12: 383
- Cook DL, Taborsky GJ:** B-cell Function and Insulin secretion. In: Porte D Jr, Sherwin M: *Diabetes Mellitus*, 5. Auflage, Appleton & Lange, 1997: 49-74
- Da Silva L, De Marcucci OL, Kuhnle ZR:** Dietary polyunsaturated fats suppress the high-sucrose-induced increase of rat liver pyruvate dehydrogenase levels. *Biochimica et Biophysica Acta* 1993; 1169: 126-134
- De Fronzo RA, Ferrannini E, Hendler R, Felig P, Wahren J:** Regulation of splanchnic and peripheral glucose uptake by insulin and hyperglycemia. *Diabetes* 1983; 32: 35-45
- De Fronzo RA, Simonson D, Ferrannini E:** Hepatic and peripheral insulin resistance: a common feature of type 2 (non-insulin-dependent) and type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1982; 23: 313-319
- De Fronzo RA:** Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 2004; 88: 787-835
- De Fronzo RA:** Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes* 1997; 5: 117-269
- De Souza CJ, Eckhardt M, Gagen K, Dong M, Chen W, Laurant D, Burkley F:** Effects of Pioglitazone on adipose tissue remodelling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2001; 50: 1863-1871
- Desvergne B, Wahli W:** Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20: 649-688

- Dunstan DW, Zimmet PZ, Welborn TA:** The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance. The Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study. *Diabetes Care* 2002; 25: 829-34
- Ekberg K, Landau BR, Wajngot A, Chandramouli V, Efendic S, Brunengraber H, Wahren J:** Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes* 1999; 48: 292-298
- Even PC, Rolland V, Roseau S, Bouthegourd JC, Tomé D:** Prediction of basal metabolism from organ size in the rat: relationship to strain, feeding, age, and obesity. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2001; 280: R1887-R1896
- Ferrannini E, De Fronzo RA:** Insulin actions in vivo: glucose metabolism In: DeFronzo RA, Ferrannini E, Keen H, Zimmet P: *International Textbook of Diabetes Mellitus*, John Wiley & Sons, 2004; 3. Auflage: 277-301
- Ferrannini E:** The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. *Metabolism* 1988; 37: 287-301
- Forman BM, Chen J, Evans RM:** Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94 (4): 4312-4317
- Frame S, Cohen P:** GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery *Biochem J* 2001; 359: 1-16
- Frayn KN:** Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange. *J Appl Physiol* 1983; 55: 628-634
- Frenz U:** Bestimmung der Energie- und Makronährstoffversorgung bei Ratten unter Diäten mit leicht unterschiedlichen Aminosäuregehalten – Neue optimierte Methoden der indirekten Kalorimetrie. *Inaugural Dissertation an der Freien Universität Berlin* 1994
- Garber AJ:** Metformin and other biguanides: pharmacology and therapeutic usage. In: DeFronzo RA, Ferrannini E, Keen H, Zimmet P: *International Textbook of Diabetes Mellitus*, John Wiley & Sons, 2004; 3. Auflage: 851-869
- Gerich JE, Nurjhan N:** Gluconeogenesis in type 2 diabetes. *Adv Exp Med Biol* 1993; 334: 253-258

- Gibbons GF, Wiggins D, Brown AM, Hebbachi AM:** Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochemical Society Transactions* 2004; 32: 59-64
- Griffen S, Wang J, German M:** A genetic defect in β -cell gene expression segregates independently from the fa locus in the ZDF rat. *Diabetes* 2001; 50: 63-68
- Grundy AM:** Small LDL, atherogenic dyslipidemia and the metabolic syndrome. *Circulation* 1997; 95: 1-4
- Grundy SM, Brewer BH, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C:** Definition of the metabolic syndrome. Report of the national heart, lung, and blood institute/american heart association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; 109: 433-438
- Harris RA, Bowker-Kinley MM, Huang B, Wu P:** Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Advances in Enzyme Regulation* 2002; 42: 249-259
- Harris RA, Huang B, Wu P:** Control of pyruvate dehydrogenase kinase gene expression. *Advances in Enzyme Regulation* 2001; 41: 269-288
- Heldmaier G, Neuweiler G:** Energiehaushalt von Tieren. In: *Vergleichende Tierphysiologie, Band 2 Vegetative Physiologie*, Springer Verlag, 2004: 53-91
- Henquin JC:** Glucose-induced electrical activity in b-cells. Feedback control of ATP-sensitive K channels by Ca_{2+} . *Diabetes* 1990; 39: 1457-1460
- Hepp KD, Häring HU:** Einführung in die Biochemie und Pathophysiologie des Stoffwechsels. In: Mehnert H, Standl E, Usadel KH: *Diabetologie in Klinik und Praxis*, Thieme Verlag, 1999, 4. Auflage: 1-30
- Holman GD, Kasuga M:** From receptor to transporter: insulin signaling to glucose transport. *Diabetologia* 1997; 40: 991-1003
- Holness MJ, MacLennan PA, Palmer TN, Sugden MC:** The disposition of carbohydrate between glycogenesis, lipogenesis and oxidation in liver during the starved-to-fed transition. *Biochem J* 1988; 252: 325-330
- Holness MJ, Sugden MC:** Pyruvate dehydrogenase activities during the fed-to-starved transition and on re-feeding after acute or prolonged starvation. *Biochem J* 1989; 258: 529-533

- Holness MJ, Bulmer K, Smith ND, Sugden MC:** Investigation of potential mechanisms regulating protein expression of hepatic pyruvate dehydrogenase kinase isoforms 2 and 4 by fatty acids and thyroid hormone. *Biochem J* 2003; 369: 687-695
- Huang B, Gudi R, Wu P, Harris RA, Hamilton J, Popov KM:** Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase. DNA-derived amino acid sequences, expression and regulation. *J Biol Chem* 1998; 273: 17680-17686
- Huang B, Wu P, Popov KM, Harris RA:** Starvation and diabetes reduce the amount of pyruvate dehydrogenase phosphatase in rat heart and kidney. *Diabetes* 2003; 52: 1371-1376
- Iida M, Murakami T, Ishida K, Mizuno A, Kuwajima M, Shima K:** Substitution at codon 269 (Glutamine → Proline) of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker Fatty (fa/fa) rat. *Biochemical and biophysical research communications* 1996; 224: 597-604
- International Diabetes Federation,** Brüssel: Diabetes Atlas 2003
- International Diabetes Federation,** Brüssel: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. 2005
- Iozzo P, Hallstein K, Oikonen V, Kirsj AV, Kempainen J, Solin O, Ferrannini E, Knuuti J, Nuutila P:** Insulin-mediated hepatic glucose uptake is impaired in type 2 diabetes: evidence for a relationship with glycemic control. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003; 88: 2055-2060
- Itani SI, Rudermann NB, Schmieder F, Boden G:** Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C and I κ B- α . *Diabetes* 2002; 51: 2005-2011
- Itoh Y, Esako T, Shimoji K, Cook M, Law MJ, Kaufmann E:** Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 4879-4884
- Jeoung NH, Wu P, Jaskiewicz J, Depaoli-Roach A, Harris RA:** The role of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK4) in glucose homeostasis during starvation. *Diabetes* 2002; 51, Supplement 2: A316

- Jin ES, Burgess SC, Merritt ME, Sherry AD, Malloy CR:** Differing mechanisms of hepatic glucose overproduction in triiodothyronine-treated rats vs. Zucker diabetic fatty rats by NMR analysis of plasma glucose. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E654-E662
- Kahn BB, Flier JS:** Obesity and insulin resistance. *J Clin Inv* 2000; 106: 473-481
- Kahn SE, Porte D Jr:** The pathophysiology of type II (non-insulin dependent) diabetes mellitus: implications for treatment. In: Porte D Jr, Sherwin RS: *Diabetes mellitus*, Appleton & Lange, 1997, 5. Auflage: 487-512
- Kaiyala KJ, Prigeon RL, Kahn SE, Woods SC, Porte JrD, Schwartz MW:** Reduced β -cell function contributes to impaired glucose tolerance in dogs made obese by high-fat feeding. *Am J Physiol* 1999; 277: E659-E667
- Karlson P, Doencke D, Koolman J:** Stoffwechsel der Proteine und Aminosäuren. In: *Biochemie*, Georg Thieme Verlag, 1994; 14. Auflage: 165-204
- Kellerer M, Häring HU:** Epidemiologie, Klinik, Ätiologie und Pathogenese des Typ-2-Diabetes. In: Mehnert H, Standl E, Usadel KH: *Diabetologie in Klinik und Praxis*, Thieme Verlag, 1999, 4. Auflage: 53-56
- Kelley D, Mitrakou A, Marsh H, Schwenk F, Benn J, Sonnenberg G, Arcangell M, Aoki T, Sorensen J, Berger M, Sonksen P, Gerich J:** Skeletal muscle glycolysis, oxidation and storage of an oral glucose load. *J Clin Invest* 1988; 81: 1563-1571
- Kelley DE, Mandarino LJ:** Perspectives in Diabetes, Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance, A reexamination. *Diabetes* 2000; 49: 677-683
- Keppler D, Decker K:** Poly-, Oligo- und Disaccharide. In: Bergmeyer: *Methoden der enzymatischen Analyse, Band II*, Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße, 1974; 3. Auflage: 1171-1233
- Klip A, Ramlal T, Young DA, Holloszy JO:** Insulin-induced translocation of glucose transporters in rat hindlimb muscles. *FEBS Lett* 1987; 24: 224-230
- Korotchkina LG, Patel MS:** Probing the mechanism of inactivation of human pyruvate dehydrogenase by phosphorylation of three sites. *J Biol Chem* 2001 (a); 276: 5731-5738
- Korotchkina LG, Patel MS:** Site specificity of four pyruvate dehydrogenase kinase isoenzymes toward the three phosphorylation sites of human pyruvate dehydrogenase. *J Biol Chem* 2001 (b); 276: 37223-37229

- Krssak M, Brehm A, Bernroider E, Anderwald C, Nowotny P, Man CD, Cobelli C, Cline GW, Shulman GI, Waldhäusl W, Roden M:** Alterations in postprandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 1-9
- Kuhlmann J, Neumann-Haefelin C, Belz U, Kalisch J, Juretschke HP, Stein M, Kleinschmidt E, Kramer W, Herling AW:** Intramyocellular lipid and insulin resistance. A longitudinal in vivo ¹H-spectroscopic study in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* 2003; 52: 138-144
- Kwon HS, Harris RA:** Mechanisms responsible for regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 gene expression. *Advan. Enzyme Regul* 2004; 44: 109-121
- Lam TKT, Gutierrez-Juarez R, Poci A, Rossetti L:** Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science* 2005; 309: 943-947
- Landgraf R, Haslbeck M:** Diagnose und Differentialdiagnose. In: Mehnert H, Standl E, Usadel KH: *Diabetologie in Klinik und Praxis*, Thieme Verlag, 1999, 4. Auflage: 71-102
- Langerhans P:** Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse. *Medizinische Dissertation, Berlin 1869*
- Laube H, Mehnert H:** Ernährungstherapie. In: Mehnert H, Standl E, Usadel KH: *Diabetologie in Klinik und Praxis*, Thieme Verlag, 1999, 4. Auflage: 120-146
- Lee FN, Zhang L, Zheng D, Choi WS, Youn JH:** Insulin suppresses PDK-4 expression in skeletal muscle independently of plasma FFA. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E69-E74
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM:** Glykolysis and the catabolism of hexoses. In: *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, 1993; 2. Auflage: 400-441
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM:** Protein metabolism. In: *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, 1993; 2. Auflage: 892-939
- Lemberger T, Desvergne B, Wahli W:** Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1996; 12: 335-363
- Löffler G, Petrides PE:** Biochemie und Pathobiochemie, Springer-Verlag, 1997; 5. Auflage
- Malmström R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Järvinen H, Shepherd J, Taskinen MR:** Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia* 1997; 40: 454-462

- Mann WR, Dragland CJ, Vinluan CC, Vedananda TR, Bell PA, Aicher TD:** Diverse mechanisms of inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase by structurally distinct inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1480: 283-292
- Mayers RM, Butlin RJ, Kilgour E, Leighton B, Martin D, Myatt J, Orme JP, Holloway BR:** AZD7545, a novel inhibitor of pyruvate dehydrogenase kinase 2 (PDHK2), activates pyruvate dehydrogenase in vivo and improves blood glucose control in obese (fa/fa) Zucker rats. *Biochemical Society Transactions* 2003; 31: 1165-1167
- Mayers RM, Leighton B, Kilgour E:** PDH kinase inhibitors: a novel therapy for Type II diabetes?. *Biochemical Society Transactions* 2005; 33 (2): 367-370
- McCune SA, Durant PJ, Jenkins PA, Harris RA:** Comparative studies on fatty acid synthesis, glycogen metabolism, and gluconeogenesis by hepatocytes isolated from lean and obese Zucker rats. *Metabolism* 1981; 30: 1170-1178
- McFarlane IA, Bliss M, Jackson JGL, Williams G:** Section 1: Diabetes in its historical and social context. In: Pickup JC, Williams G: *Textbook of diabetes*, volume 1, second edition, Oxford: Blackwell Science, 1997
- McGarry JD:** What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. *Science* 1992; 258: 766-770
- Meyer HU, Curchod B, Maeder E, Pahud P, Jequier E, Felber JP:** Modifications of glucose storage and oxidation in nonobese diabetics, measured by continuous indirect calorimetry. *Diabetes* 1980; 29: 752-756
- Morrell JA, Orme J, Butlin RJ, Roche TE, Mayers RM, Kilgour E:** AZD7545 is a selective inhibitor of pyruvate dehydrogenase kinase 2. *Biochemical society transactions* 2003; 31: 1168-1170
- Neel JV:** Diabetes mellitus: a thrifty genotype rendered detrimental by "progress"?. *Am J Hum Genet* 1962; 14: 353-362
- Newgard CB, Hirsch LJ, Foster DW, McGarry JD:** Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into liver glycogen in the rat, a direct or an indirect pathway?. *The Journal of Biological Chemistry* 1983; 258: 8046-8052
- Niewoehner CB, Gilboe DJ, Nuttall FQ:** Metabolic effects of oral glucose in the liver of fasted rats. *Am J Physiol* 1984; 246: E98-E94

- Noack R:** Energiehaushalt. In: Biesalski HK, Fürst P, Kasper H, Kluthe R, Pöler W, Puchstein C, Stähelin HB: *Ernährungsmedizin* Thieme Verlag, 1995; Sonderdruck: 19-29
- Okar DA:** Starvation admist plenty: PDKs and diabetes mellitus. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2002; 13, (4): 142
- Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, Bogardus C, Howard BV, Ravussin E:** A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia* 1995; 38: 1213-1217
- Patel MS, Korotchkina LG.:** Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. *Experimental and Molecular Medicine* 2001; 33, (4): 191-197
- Patel MS, Korotchkina LG.:** The biochemistry of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 2003; 31, (1): 5-15
- Patel MS, Korotchkina LG:** Pyruvate dehydrogenase complex as a marker of mitochondrial metabolism. Inhibition by 4-hydroxy-2-nonenal. *Methods in Molecular Biology* 2002; 168: 255-263
- Pessin JE, Saltiel AR:** Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Inv* 2000; 106: 165-169
- Polonsky KS, Sturis J, Bell GI:** Non-insulin-dependent diabetes mellitus – a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med* 1996; 334: 777-783
- Qvigstad E, Mostad IL, Bjerve KS, Grill VE:** Acute lowering of circulating free fatty acids improves insulin secretion in a subset of type 2 diabetes subjects. *Am J Physiol* 2003; 284: E129-E137
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA:** The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *The Lancet* 1963: 785-789
- Randle PJ.:** Fuel selection in animals. *Biochem Soc Trans* 1986; 14: 799-806
- Reaven GM:** Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-1607
- Reed LJ:** Multienzyme complexes. *Accts Chem Res* 1974; 7: 40-46

- Roche TE, Hirosama Y, Turkan A, Gong X, Peng T, Yan X, Kasten SA, Bao H, Dong J:** Central organization of mammalian pyruvate dehydrogenase (PD) complex and lipoyl domain-mediated activated function and control of PD kinases and phosphatase 1. In: Jordan F, Patel MS, Dekker M: *Thiamine - catalytic mechanisms in normal and disease states*: 2003: 363-386
- Rosak Ch, Böhm BO:** Behandlung mit Insulin. In: Mehnert H, Standl E, Usadel KH: *Diabetologie in Klinik und Praxis*, Thieme Verlag, 1999, 4. Auflage: 182-211
- Schaaf L, Usadel KH:** Hypoglykämie. In: Mehnert H, Standl E, Usadel KH: *Diabetologie in Klinik und Praxis*, Thieme Verlag, 1999, 4. Auflage: 637-644
- Schimassek H:** Glycogen synthesis in rat liver from a pool of free glucose. *Z Naturforsch* 1993; 48: 85-91
- Schutz Y:** On problems of calculating energy expenditure and substrate utilization from respiratory exchange data. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaften* 1977; 36: 255-262
- Schutz Y:** The basis of direct and indirect calorimetry and their potentials. *Diabetes/Metabolism Reviews* 1995; 11: 383-408
- Shulman GI, Landau BR:** Pathways of glycogen repletion. *Physiol Rev* 1992; 72: 1019-1035
- Shulman GI:** Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin investment* 2000; 106: 171-176
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC:** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 1985; 150: 76-85
- Stacpoole PW, Greene YJ:** Dichloroacetate. *Diabetes Care* 1992; 15 (6): 785-791
- Stacpoole PW:** Lactic acidosis and other mitochondrial disorders. *Metabolism* 1997; 46 (3): 306-321
- Stone BG, van Thiel DH:** Diabetes mellitus and the liver. *Sem Liver Dis* 1985; 5: 8-28
- Stryer L:** Biochemie, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, 1988, Übersetzung von der 3. amerikanischen Auflage
- Sugden MC, Holness MJ:** Effects of re-feeding after prolonged starvation on pyruvate dehydrogenase activities in heart, diaphragm and selected skeletal muscles of the rat. *Biochem J* 1989; 262: 669-672

- Sugden MC, Kraus A, Harris RA, Holness:** Fibre-type specific modification of the activity and regulation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) by prolonged starvation and refeeding is associated with targeted regulation of PDK isoenzyme 4 expression. *Biochemical Journal* 2000; 346: 651-657
- Tan J, Yang HS, Patel MS:** Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase alpha subunit gene expression by glucose in HepG2 cells. *Biochemical Journal* 1998; 336: 49-56
- The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus:** Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26: 5-20
- Thompson AL, Cooney GJ:** Acyl-CoA inhibition of hexokinase in rat and human skeletal muscle is a potential mechanism of lipid-induced insulin resistance. *Diabetes* 2000; 49: 1761-1765
- Thorburn AW, Gumbiner B, Bulacan F, Wallace P, Henry RR:** Intracellular glucose oxidation and glycogen synthase activity are reduced in non-insulin-dependent (Type II) diabetes independent of impaired glucose uptake *The Journal of Clinical Investigation* 1990; 85: 522-529
- Triscari J, Bryce GF, Sullivan AC:** Metabolic consequences of fasting in old lean and obese Zucker rats. *Metabolism* 1980; 29: 377-385
- Ulmer HV:** Energiehaushalt. In: Schmidt RF, Thews G: *Physiologie des Menschen*, Springer Verlag, 1997; 27. Auflage: 641-648
- Unger RH:** How obesity causes diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *Trends Endocrinol Metab* 1997; 7: 276-282
- Unger RH:** Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med* 2002; 53: 319-336
- Warram JH, Martin BH, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR:** Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia preceded the development of type II diabetes in the offspring of diabetic patients. *Ann intern Med* 1990; 113: 909-915
- Wells PG, Moore GW, Rabin D, Wilkinson GR, Oates JA, Stacpoole PW:** Metabolic effects and pharmacokinetics of intravenously administered dichloroacetate in humans. *Diabetologia* 1980; 19: 109-113
- Wild S, Roglic G, Green A:** Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27 (5): 1047-1053

- World Health Organization:** Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Part I: diagnosis and classification of diabetes mellitus. *WHO, Genf*. 1999
- Wu P, Inskeep K, Bowler-Kinley MM, Popov KM, Harris RA.** Mechanisms responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes. *Diabetes* 1999; 48:1593-1599
- Wu P, Peters JM, Harris RA:** Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor α . *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 287: 391-396
- Yki-Järvinen H:** The insulin resistance syndrom. In: DeFronzo RA, Ferrannini E, Keen H, Zimmet P: *International Textbook of Diabetes Mellitus*, John Wiley.& Sons, 2004; 3. Auflage: 359-373
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE:** Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001; 108: 1167-1174
- Zucker LM, Zucker TF:** Fatty, a new mutation in the rat. *The Journal of Heredity* 1961; 52: 275-278
- Zucker LM:** Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipidemia. *Ann NY Acad Sci* 1965; 131: 447-458

VII Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt **PD Dr. Andreas Herling** für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und seinem persönlichen Engagement, auch in Bezug auf meine weitere berufliche Zukunft, sowie **Dr. Ulrich Werner** für die wertvolle fachliche Betreuung, das rege Interesse an meiner Arbeit und die vielen Denkanstöße bei der Diskussion der Versuchsergebnisse.

Maren Großmann, Michael Hofmann, Manfred Gerlach und Joachim Thönges möchte ich für die freundliche Aufnahme in das Labor, die stetige Hilfsbereitschaft und die vielen Tips u.a. im Umgang mit Versuchstieren danken.

Dr. Norbert Tennagels danke ich für die anregenden Diskussionen rund um die PDH und die PDK, die zahlreichen Durchsichten der Manuskripte und seinem Feedback zu meiner Arbeit.

Ich danke *Dr. Dieter Schmoll* für die zahlreichen konstruktiven Diskussionen und dafür, dass er sich immer Zeit für meine Probleme nahm.

Bei *Dr. Guido Haschke* und *Rolf Stein* möchte ich mich für die Einarbeitung in die indirekte Kalorimetrie und für die über die Wissenschaft hinaus gehenden Gespräche bedanken.

Ein weiterer Dank geht an *Stefan Welte* für die geduldige Einarbeitung in die biochemische Methodik, den Erfahrungsaustausch bei praktischen Problemen und die Beantwortung zahlreicher Fragen.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern aus dem Labor *Dr. Gabriele Biemer-Daub*, Labor *Prof. Dr. Jürgen Sandow*, sowie Labor *Dr. Ludwig Schäfer* für die Analyse unzähliger Blut- und Organproben.

Prof. Dr. Mulchand Patel möchte ich für seine wissenschaftlichen Kenntnisse und seine rege Diskussionsbereitschaft danken, die diese Arbeit wesentlich unterstützt haben.

Bei den *Tierpflegern* möchte ich mich für die Betreuung der Versuchstiere bedanken.

Allen Mitarbeitern des „Therapeutic Department Metabolism“ möchte ich für das angenehme Arbeitsklima danken.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Eltern, *Marliese und Raimund Schummer*, die mir dieses Studium ermöglicht haben.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5024-X



®